

ANALYSE DER DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN
VON CHROMOSOMENABERRATIONEN
NACH STRAHLEN- UND BLEOMYCINEXPOSITION
VERSCHIEDENER MENSCHLICHER
LYMPHOCYTENFRAKTIONEN IN VITRO

Joachim Dresp

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus dem Institut für Biologie, Abteilung für Strahlen-
biologie, der Gesellschaft für Strahlen- und Umwelt-
forschung mbH München
(Leiter: Prof. Dr. U. Hagen)

Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen
von Chromosomenaberrationen
nach Strahlen- und Bleomycinexposition
verschiedener menschlicher Lymphocytenfraktionen
in vitro.

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Joachim Dresp
aus Berlin
September 1979

Sondervotum: Prof. Dr. M. Bauchinger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Schwarzfischer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1979



Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methode	2
2.1.	Blutspender	2
2.2.	Reagenzien	2
2.3.	Trennverfahren	3
2.3.1.	Säulen-Eluierung über Nylon-Wolle	3
2.3.2.	Rosettentechnik mit Schaferythrocyten	3
2.3.3.	Buffy-Coat	4
2.4.	Kulturbedingungen	4
2.5.	Chromosomenpräparationen	4
2.6.	Bestrahlungsbedingungen	5
2.7.	Bleomycin-Behandlung	5
2.8.	Chromosomenanalyse	6
2.8.1.	Mikroskopische Analyse	6
2.8.2.	Statistische Analyse	7
3.	Ergebnisse	8
3.1.	Analyse der Trennverfahren	8
3.1.1.	Nylon-Wolle-Säule	10
3.1.2.	Rosetten-Technik	13
3.1.3.	Buffy-Coat	15
3.2.	Kulturbedingungen	17
3.3.	Cytogenetische Befunde	18
3.3.1.	Strahlenexposition	18
3.3.2.	Bleomycin-Behandlung	24

4.	Diskussion	33
4.1.	Analyse der Trennverfahren	33
4.1.1.	Nylon-Wolle-Säule	36
4.1.2.	Rosetten-Technik	37
4.1.3.	Buffy-Coat	41
4.2.	Kulturbedingungen	42
4.3.	Strahlenempfindlichkeit	44
4.4.	Empfindlichkeit gegenüber chemischen Substanzen	49
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

Menschliche Lymphocyten des peripheren Blutes stellen keine homogene Zellpopulation dar. Darüber hinaus ist auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit in Bezug auf den strahleninduzierten Zelltod von zumindest zwei Subpopulationen bekannt. Dabei sind thymusabhängige T-Lymphocyten relativ resistent, thymusunabhängige B-Lymphocyten jedoch sensibel. Befunde aus cytogenetischen Experimenten die mit standardisierten Kulturverfahren durchgeführt wurden, scheinen ebenfalls auf verschiedene Lymphocytenpopulationen mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit hinzudeuten. Bisher liegen jedoch keine detaillierten Untersuchungen einzelner Zellfraktionen vor, die dies eindeutig bestätigen können.

Der Frage nach einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber exogenen Noxen, wie Strahlung oder chemischen Substanzen, kommt dann eine besondere Bedeutung zu, wenn man den induzierten Chromosomenschaden als quantitatives Maß für die Einwirkung benutzen möchte. Für Strahlung wird dies im Rahmen der medizinischen Strahlenschutzüberwachung zu einer biologischen Dosisabschätzung, für chemische Substanzen, im Rahmen der Mutagenitätstestung angestrebt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein für cytogenetische Analysen geeignetes Trennverfahren zu entwickeln, mit dem verschiedene Lymphocyten-Zellfraktionen gewonnen werden können. Nach Strahlenexposition und Bleomycin-Behandlung in vitro sollen dann durch die Analyse der Dosiswirkungskurven für bestimmte Chromosomendefekte Aussagen über eine potentiell unterschiedliche Empfindlichkeit dieser Zellfraktionen gemacht werden.

2. Material und Methode

2.1. Blutspender

Für alle Experimente, die zur Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen benutzt wurden, wurde Armvenenblut einer gesunden, unbestrahlten männlichen Person der Blutgruppe O, Rh+ verwendet. Die Blutentnahme erfolgte steril in der Ambulanz einer Blutbank unter Zusatz von Heparin ($600 \text{ E ml}^{-1} \triangleq 0.25 \text{ ml Heparin/10ml Vollblut}$), unmittelbar vor jedem Versuch. Der durchschnittliche Abstand zwischen zwei Blutentnahmen betrug zwei Wochen.

2.2. Reagenzien

Für die Untersuchungen wurden folgende Reagenzien bzw. Substanzen verwendet. Die Abkürzungen werden im Text benutzt.

BLM = Bleomycin, Mack, Illertissen.

Colcemid, Ciba S.A. Basel.

FCS = fötales Kalbserum, getrocknet, Difco, Lab., Detroit, Mich., U.S.A.

Ficoll-Isopaque-Lösung, $D = 1.077 \text{ g/ml}$, Apotheke der Universitätsklinik München.

FITC-Ig = Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat-konjugiertes Anti-Human-Immunglobulin, Behring-Werke, Marburg.

HAM'S F 10, Nutrient Mixture mit L-Glutamin, Gibco-Bio-Cult, Glasgow, U.K.

Heparin, 600 E/ml , Apotheke der Universitätsklinik München.

Lymphoprep, $D = 1.077 \text{ g/ml}$, Nyegaard u. Co. A/S Oslo.

Mc Coy's 5 A Medium, modifiziert mit 30% FCS und L-Glutamin, Gibco-Bio-Cult, Glasgow, U.K.

NaN_3 = Natriumazid, Merck, Frankfurt.

NH_4Cl -Lösung: 0.75%, mit 0.02 M TRIS auf pH 7.8 eingestellt.

Nylon-Wolle, Leuko-Pak, Leukocyten-Filter, Fenwal Travenol, Deerfield, Ill. U.S.A.

PBS = Dulbeccos Phosphate Buffered Saline Ca- und Mg frei, Gibco-Bio-Cult, Glasgow U.K.

PHA-M = Bacto-Phytohämagglutinin-M, Difco Lab.,
Detroit, Mich. U.S.A.

PHA-P = Bacto-Phytohämagglutinin-P, Difco Lab.,
Detroit, Mich. U.S.A.

PWM = Pokeweed-Mitogen, Difco Lab. Detroit, Mich. U.S.A.

SRBC = Schaferythrocyten, von PD Dr. U. Fink,
TU-Klinikum "Rechts der Isar" München,
freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Test-Neuraminidase aus *Vibrio comma*, Behring-Werke Marburg.

2.3. Trennverfahren

Zur präparativen Trennung von T- und B-Lymphocyten des Vollbluts wurden zwei verschiedene Verfahren benutzt, die für analytische Fragestellungen häufig Anwendung finden und auch eine für die Chromosomenanalyse notwendige Zellkultur aussichtsreich erscheinen ließen. Es sind dies die Rosettentechnik und die Trennung über Nylon-Wolle. Zur Abtrennung weißer Blutzellen aus dem Vollblut wurde die "Buffy-Coat"-Methode angewandt.

2.3.1. Säulen-Eluierung über Nylon-Wolle

Beim Durchgang durch eine vorher mit Serum inkubierte Nylon-Wolle-Säule bleiben B-Lymphocyten an der Nylon-Wolle haften, während T-Lymphocyten die Säule passieren (29). Anschließend werden die B-Lymphocyten mit Hank'scher Lösung eluiert (48).

2.3.2. Rosettentechnik mit Schaferythrocyten.

Gewaschene und mit Neuraminidase sensibilisierte SRBC werden im Verhältnis 20 : 1 mit einer Suspension von Humanlymphocyten versetzt. Die SRBC lagern sich hierbei an die T-Lymphocyten derart an, daß rosettenförmige Gebilde entstehen. Bei anschließender Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich die SRBC und die Rosetten am Boden des Zentrifugenglases, während die nicht-Rosettenbildenden Zellen - somit auch die B-Lymphocyten - oberhalb des Trennmediums verbleiben (10).

2.3.3. Buffy-Coat

5 ml heparinisiertes Vollblut werden für 10 Minuten bei 60 g zentrifugiert. Dabei bildet sich über den sedimentierten Erythrocyten eine Lage weißer Blutzellen (Buffy-Coat). Diese wird vorsichtig mit einer Pasteuer-Pipette abgenommen und man erhält eine fast erythrocytenfreie Zellsuspension.

2.4. Kulturbedingungen

Die Zellen - im Falle der Standardkultur 0,5 ml Vollblut - wurden in 4 ml F 10 Medium, das mit Streptomycin und Penicillin versetzt war (je 100.000 i.E. auf 100 ml), 0,5 ml fötalem Kalbserum (FCS) und 0.13 ml Phytohämagglutinin kultiviert. Je nach Ansatz wurde die M- oder P-Form verwandt. Unter Einfluß dieses mitogenen Extrakts aus *Phaseolus vulgaris* transformieren sich die kleinen Lymphocyten zu blastenartigen Zellen und treten in die Mitose ein.

Drei Stunden vor Ende der 48stündigen Kulturzeit wurde Colcemid (0.1 µg/ml) zugesetzt um eine Anreicherung an Metaphase-Stadien zu erreichen.

2.5. Chromosomenpräparationen

Die Lymphocyten wurden bei 300 g für 5 Minuten abzentrifugiert, einmal mit Hank'scher Lösung gewaschen und anschließend hypoton behandelt. Dazu wurden sie mit 0,4 ml Hank'scher Lösung und 1.8 ml Aqua dest. 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Fixierung erfolgte in einer Methanol-Eisessig-Mischung (3:1) für 30 Minuten. Die Zellsuspension wurde dann auf in Aqua dest. gekühlte Objektträger aufgetropft. Dabei platzen die Lymphocyten und die Chromosomen der einzelnen Metaphaseplatten breiten sich flach auf dem Glas aus. Die Objektträger

werden kurz über einer Flamme getrocknet, die Präparate anschließend mit Feulgenlösung und Orcein-Eisessig gefärbt. Nach Eindeckung mit Caedax waren sie der mikroskopischen Analyse zugänglich.

2.6. Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlung erfolgte mit 220 kV Röntgenstrahlung (14mA, Filterung 1 mm Cu) einer Siemens-Stabilipan Anlage in den Dosen 50, 100, 200 und 400 R. Die Dosisleistung betrug 50 R/min. Je nach Versuchsansatz wurden dazu die Lymphocyten in 25 ml Falcon Flaschen (Falcon-Tissue-Culture-Flask Nr. 3012, Falcon Plastics Los Angeles, Cal. U.S.A.) oder in sterilen Einwegspritzen in einem Plexiglasgehäuse, das mit einer Wärmequelle und einem elektronischen Temperaturregler ausgestattet war, bei 37° C bestrahlt. Die Dosismessung erfolgte mit einem Siemens-Universaldosimeter, dessen Ionisationskammer in derselben Position wie die zu bestrahlenden Blutproben angebracht war.

2.7. Bleomycin-Behandlung

BLM wurde am Versuchstag in steriler Hank'scher Lösung aufgelöst und die Lymphocyten mit Endkonzentrationen von 35, 75, 150, 300 µg BLM/ml behandelt. Dazu wurden die Ansätze für 3 Stunden in mit Silikonstopfen verschlossenen 10 ml Reagenzgläsern bei 37° C inkubiert. Zur Entfernung des BLM wurden vor Kulturansatz die Zellen einmal mit Hank'scher Lösung und einmal mit Kulturmedium HAM's F 10 (Zentrifugation bei 300 g) gewaschen.

2.8. Chromosomenanalyse

2.8.1. Mikroskopische Analyse

Die Auswertung geschah mit Hilfe eines Photomikroskops (ZEISS) bei ca. 1600-facher Vergrößerung mit Ölimmersion im Phasenkontrast. Die zu analysierenden Metaphaseplatten durften nicht zerrissen sein, mußten gut gefärbt und gespreitet sein sowie 46 Centromere aufweisen. Es wurden mindestens 200 Zellen pro Dosis bzw. Konzentration ausgewertet. Dabei wurden sämtliche Aberrationen registriert und die Häufigkeit der verschiedenen Aberrationstypen bestimmt. Die Klassifikation der Aberrationstypen erfolgte nach einem Schema von Bauchinger (1972). Als U-Zellen werden dabei Zellen mit unspezifischen Chromosomendefekten bezeichnet. Diese sind nicht mit einer echten Diskontinuität der Chromosomenstruktur verbunden. Ein Beispiel dafür sind achromatische Lücken oder "gaps", die als feulgen-negative Regionen im Metaphasechromosom erkennbar sind.

S-Zellen sind Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen. Beispiele hierfür sind Chromatidbrüche, Chromatidaustauschfiguren, interstitielle Deletionen oder "minutes", sowie intra- oder interchromosomale Strukturumbauten die zur Entstehung von Ringchromosomen, polycentrischen Chromosomen und Translokationen führen.

Fanden sich in einer Zelle mehrere nicht identische acentrische Fragmente neben den erwähnten Strukturumbauten wurde unter der Annahme kompletter Austauschprozesse ein Fragment der Austauschaberrationen zugeordnet, alle weiteren als überzählige acentrische Fragmente bewertet.

In der Rate der dicentrischen Chromosomen sind alle polycentrischen Chromosomen enthalten. Dazu wurde z.B. ein tricentrisches Chromosom wie zwei dicentrische bewertet, entsprechend den mindestens zu seiner Entstehung nötigen vier Primärbrüchen. Für die Entstehung eines tetracentrischen Chromosoms müssen sechs Bruchereignisse stattge-

funden haben, also dreimal so viele wie für ein dicentrisches. Es wird daher drei dicentrischen Chromosomen gleichgestellt.

2.8.2. Statistische Analyse

Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehungen dicentrischer Chromosomen wurden Dosiswirkungskurven erstellt. Ihre mathematische Beschreibung erfolgte durch eine Anpassung verschiedener Modelle der Dosis-Wirkungsbeziehung an die empirischen Meßdaten (Aberrationshäufigkeit) mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate. Geprüft wurde die lineare Funktion $y = a + bD$ (y = Aberrationsausbeute, D = Dosis) sowie ein linear-quadratisches Modell $y = c + \alpha D + \beta D^2$ α und β sind Koeffizienten der Aberrationsinduktion, c = Aberrationshäufigkeit in Kontrollen).

Die Signifikanz der Anpassung des vorgegebenen Modells an die empirischen Daten wurde mit Hilfe eines von EDWARDS (1977) entwickelten "goodness-of-fit" geprüft, der einen für cytogenetischen Fragestellungen modifizierten χ^2 -Test darstellt. Es wurde folgende Gleichung benützt:

$$A = \sum_{i=1}^n \frac{(F(D_i) - y_i)^2}{E_i}$$

Dabei ist D die Dosis, welche die Rate y der dicentrischen Chromosome ergibt, die mit dem Standardfehler E behaftet ist. Wenn $F(D)$ die richtige Beziehung zwischen der Rate dicentrischer Chromosomen und der Dosis beschreibt, dann ist A bei $u-m$ Freiheitsgraden nach χ^2 verteilt.

Der Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen, die für verschiedene Lymphocytenpräparationen errechnet wurden, erfolgte mit Hilfe eines Identitätstests nach SCHNEEBERGER (1960). Dazu wurde geprüft, ob sich die entsprechenden Funktionen auf dem Signifikanzniveau von $P = 0.05$ unterscheiden.

3. Ergebnisse

Voraussetzung für cytogenetische Untersuchungen ist die Kurzzeitkultur der Lymphocytenfraktionen unter Gewebezuchtbedingungen. Es mußten deshalb zunächst verschiedene Trennverfahren analysiert und eine Methode ausgearbeitet werden, die diese Anforderungen erfüllen konnte. Der Ergebnisteil gliedert sich deshalb in einen methodischen und einen cytogenetischen Abschnitt.

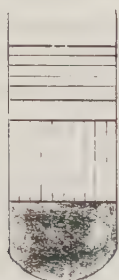
3.1. Analyse der Trennverfahren

Zuerst wurden vorhandene Trennmethoden unverändert übernommen und auf ihre Eignung für cytogenetische Fragestellung untersucht. Einige, wie z.B. die fluoreszenz-aktivierte Zellseparation und die trägerfreie Ablenkungselektrophorese schieden von vornherein aus, da sie zum damaligen Zeitpunkt weder routinemäßig verfügbar, noch auf Humanlymphocyten präparativ anwendbar waren. Bei anderen, häufig angewandten Trennverfahren, wie z.B. die Filtration über Nylon-Wolle oder die Rosettentechnik wurde versucht sie so zu verändern, daß sie auf cytogenetische Fragestellungen anwendbar wurden.

Für alle Methoden, die zu einer Trennung von B- und T-Lymphocyten führen, ist Voraussetzung, daß man erythrocytenfreie Leukocytenpräparationen zur Verfügung hat. Als erstes mußte deshalb die Eignung des Lymphocyten-separationsmediums Ficoll bzw. Lymphoprep ausgetestet werden. In 10 Versuchsreihen wurden dazu die verschiedenen Schritte der Trennung der Erythrocyten von den anderen geformten Blutbestandteilen modifiziert, z.B. Zentrifugationsgeschwindigkeit und -dauer, Mengenverhältnis Blut: Separationsmedium, Waschprozesse sowie die Gefäßbeschaffenheit. Folgende Methode erwies sich als die geeignetste:

6-12 ml Vollblut werden in einem silikonisierten Zentrifugenglas vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll von

Raumtemperatur geschichtet. Zentrifugation bei 350 g für 30 Minuten ergibt folgende Schichtung im Reagenzglas:



Plasma (gelblich)

Lymphocyten (weiß), Thrombocyten

Ficoll (opak)

Erythrocyten, Granulocyten

polymorphkernige Leukocyten

Mit einer nicht zu spitzen Pipette wird der Lymphocytenring entnommen. Ist die Pipettenöffnung zu eng, entsteht ein zu starker Sog, der die Ficoll-Lösung mit in die Pipette reißt. Das verhindert beim anschließenden Zentrifugieren (20 Minuten bei 300 g) die Sedimentation der Lymphocyten. Die Zentrifugalkraft soll jedoch 300 g nicht überschreiten, da sonst die Thrombocyten mit den Lymphocyten agglutinieren. Kontamination des Lymphocytenrings mit dem Plasma hat keinen Einfluß auf die Sedimentationsfähigkeit dieser Zellen. Anschließend werden die Lymphocyten zweimal mit Hank'scher Lösung gewaschen (Zentrifugation 10 Minuten bei 220 g). Sollten im Sediment jedoch noch Erythrocyten vorhanden sein, werden diese mit NH_4Cl -Lösung lysiert, indem man 2 ml zum Sediment gibt und dieses sofort kräftig mit einer Pasteur-Pipette suspendiert. Anschließend wird in 5 ml Hank'scher Lösung aufgenommen und für 10 Minuten bei 220 g zentrifugiert. Man erhält auf diese Weise aus 10 ml Vollblut im Durchschnitt $5 - 10 \cdot 10^6$ Lymphocyten, die man dann für eine weitere Auftrennung in T- und B-Lymphocyten verwendet, oder aber für eine reine Lymphocytenkultur benutzen kann.

3.1.1. Nylon-Wolle-Säule

Um eine erfolgreiche Trennung in T- und B-Lymphocyten mit der Nylon-Wolle-Säule zu erreichen, erwies es sich als vorteilhaft, das Vollblut im Verhältnis 1:1 mit Hank'scher Lösung zu versetzen, bevor man es zur Erythrocytenabtrennung über den Ficoll-Gradienten zentrifugiert. Die Kontamination mit Erythrocyten kann dadurch in der Lymphocyten-Schicht, die über der Ficoll-Lösung im Zentrifugenglas stehenbleibt, sehr gering gehalten werden. Nach zweimaligem Waschen der Lymphocyten mit Hank'scher Lösung werden die Lymphocyten aus 10 ml Vollblut in 1 ml Hank'scher Lösung aufgenommen. Es ist nicht möglich, käufliche Nylon-Wolle für dieses Trennverfahren unmittelbar zu verwenden. Wurde sterile, unbehandelte Nylon-Wolle benutzt, waren keine Lymphocyten aus der Säule eluierbar. Die besten Ergebnisse zeigten Trennvorgänge über Nylon-Wolle, die nach der Methode von EISEN et al. (1972) folgendermaßen vorbehandelt worden war: Über Nacht wurde Nylon-Wolle, die aus LEUKO-PAK Leukocyten-Filtern entnommen worden war, in 0.5 n HCl aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde sie gründlich in Aqua dest. gewaschen und bei 37° C getrocknet. Dann wurden ca. 0.6 g in 10 ml Einwegspritzen festgestopft und diese anschließend trocken autoklaviert. Nach gründlichem Benetzen der Säule mit Hank'scher Lösung, die mit 5 % FCS versetzt war, wurde sie 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Jetzt wurden die in 1 ml Hank'scher Lösung suspendierten Lymphocyten aus 10 ml Vollblut auf die Säule aufgebracht und diese wiederum 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Mit 10 ml Hank'scher Lösung konnten dann die nicht an die Nylon-Wolle gebundenen Zellen

aus der Säule eluiert werden. Diese wurden zweimal mit Hank'scher Lösung für 20 Minuten bei 220 g zentrifugiert. Die Kontrolle einer erfolgreichen Trennung, d.h. die thymusunabhängigen B-Lymphocyten mußten in der Säule verblieben, die thymusabhängigen T-Lymphocyten im Eluat enthalten sein, erfolgte durch eine mikroskopische Immunfluoreszenzanalyse.

Dazu wurden 5 ml Lymphocyten-Suspension aus dem Eluat mit 10 μ l FITC-Ig vermischt und 30 Minuten bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Im Abstand von 10 Minuten wurde kräftig aufgeschüttelt und anschließend, zum Auswaschen des überschüssigen FITC-Ig dreimal mit 2 ml 0.2% NaN_3 in Hank'scher Lösung für 10 Minuten bei 150 g zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde auf Objektträger aufgebracht und an einem ZEISS-AXIOMAT-Mikroskop mit Auflicht-Fluoreszenz, mit Interferenz-Breitbandfilter und folgenden Filterkombinationen beobachtet:

Erregerfilter: Bandpaß 390-440 und 450-490 nm
Sperrfilter: Langpaß 470 nm und Bandpaß 520-560 nm
Farbteiler: 460 und 510 nm

Durch Umschalten der Beleuchtungsart von Fluoreszenz auf Durchlicht konnten die mit FITC-Ig markierten B-Zellen aufgrund ihrer grün fluoreszierenden Zelloberfläche bestimmt werden. In 4 Versuchen wurden je 2 Ansätze zur Bestimmung der spezifischen Fluoreszenz durchgeführt.

Ansatz 1: Mit Hank'scher Lösung eluierbare Zellen.

Ansatz 2: Durch Zerzupfen und Auspressen der Nylon-Wolle gewonnene Zellen. Hierbei war die Ausbeute stets sehr gering.

Das Ergebnis zeigt Tab. 1.

Versuch	Ansatz	% fluoreszierende Zellen
I	1	12
	2	40
II	1	14
	2	59
III	1	8
	2	61
IV	1	11
	2	68

Tabelle 1: Anteil Ig -positiver Zellen nach Trennung
über Nylon-Wolle.

Ansatz 1 sollte eine reine T-Zellfraktion ergeben, die jedoch mit 11 % B-Lymphocyten kontaminiert war.

Ansatz 2, in dem alle B-Lymphocyten enthalten sein sollten, ergab so geringe Zellausbeuten, daß keine Kultur der B-Zellen möglich war. Außerdem wiesen nur 57 % der Zellen Fluoreszenz auf.

3.1.2. Rosetten-Technik

In insgesamt 23 Versuchen, in denen in der Literatur beschriebene bzw. in eigenen Versuchen gewonnene Erkenntnisse bezüglich der Optimierung des Trennverfahrens kombiniert wurden, konnte eine Methode erarbeitet werden, die aus 10 ml Vollblut eine ausreichende Zahl von T-Lymphocyten lieferte und bei 48 Stunden Kulturzeit einen genügend hohen Mitose-Index ergab. Dieses Verfahren läuft folgendermaßen ab:

10 ml Vollblut werden in einem silikonisierten Zentrifugenglas vorsichtig auf 7 ml Ficoll oder Lymphoprep geschichtet und 30 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Dabei soll die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet sein um beim Anhalten ein Aufwirbeln des Lymphocytenringes zu verhindern. Man nimmt die Lymphocyten-schicht mit einer 10 ml Pipette ab, wobei darauf zu achten ist, daß kein Separationsmedium mit aufgesaugt wird, da sonst die Lymphocyten beim anschließenden Abzentrifugieren (20 Minuten bei 300 g) nicht am Boden des Zentrifugenglases sedimentieren. Sind in der Lymphocytenphase noch Erythrocyten vorhanden, werden diese mit 0.75% NH_4Cl -Lösung lysiert. Dazu gibt man 2-4 ml NH_4Cl in das Zentrifugenglas, suspendiert kräftig und nimmt sofort mit 5 ml Hank'scher Lösung auf. Zu langes Einwirken der unverdünnten NH_4Cl -Lösung schädigt die Lymphocytenoberfläche derart, daß die Zellen untrennbar zusammenklumpen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 220 g werden die Zellen erneut zweimal mit Hank'scher Lösung für 10 Minuten bei 220 g zentrifugiert. Nach Bestimmung der Lymphocytenzahl wird eine Zellkonzentration von $3 \cdot 10^6/\text{ml}$ in Hank'scher Lösung eingestellt.

Die zur Rosettenbildung notwendigen Partner-Zellen, die Schaferythrocyten (SRBC), werden folgendermaßen behandelt:

Man nimmt einem Schaf unter sterilen Kautelen 2-5 ml Venenblut mit Heparin ab. Mischt man dieses mit dem Konservierungsmittel Alsever's Lösung, so kann man es ca. 2 Wochen für Rosetten-Ansätze benutzen, falls es im Kühlschrank aufbewahrt wird. Es sollte jedoch nicht am Abnahmetag zur Rosetten-Bildung benutzt werden, da sonst die Rosetten-Ausbeute qualitativ und quantitativ schlechter ist. Das Schafblut wird 10 Minuten bei 670 g sedimentiert und anschließend dreimal für 10 Minuten bei 670 g mit kaltem PBS gewaschen. Dann wird eine Stammlösung erstellt, die aus 20 ml Hank'scher Lösung und 0.3 ml SRBC-Sediment besteht. In diesem Sediment sind die Erythrocyten so dicht gepackt, daß man üblicherweise eine Konzentration von $300 \cdot 10^6$ /ml erhält. Man nimmt nun 2 ml dieser Stammlösung, verdünnt sie mit 8 ml Hank'scher Lösung und inkubiert sie für 15 Minuten unter ständiger Durchmischung mit 0.25 ml Neuraminidase. Dann wäscht man zweimal 10 Minuten bei 670 g mit Hank'scher Lösung und erhält ca. 0.5 ml SRBC-Sediment. Dieses wird in 9.5 ml Hank'scher Lösung suspendiert, wodurch eine SRBC-Suspension mit ca. $60 \cdot 10^6$ SRBC/ml entsteht, die auch noch am darauffolgenden Tag gleichgute Ergebnisse bei Rosetten-Ansätzen zeigt. Diese Rosetten-Ansätze werden folgendermaßen hergestellt:

Man mischt 4 ml der Humanlymphocyten-Suspension mit 4 ml der neuraminidasebehandelten SRBC-Suspension und erzielt damit ein Verhältnis $12 \cdot 10^6$ Lymphocyten zu $240 \cdot 10^6$ SRBC entsprechend 1:20. Diese Suspension wird 15 Minuten bei Zimmertemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Dann zentrifugiert man 10 Minuten bei 150 g und hält die Zellen für 30 Minuten bei 4° C. Nach Absaugen von 4.5 ml des Überstandes wird mit 1,5 ml 30% FCS-Mc Coy aufgefüllt. Das muß sehr vorsichtig geschehen um die Rosetten nicht zu zerstören. Die anschließende vorsichtige und dennoch vollständige

Resuspendierung des Sediments erreicht man am vorteilhaftesten durch Hin- und Herrollen der einzelnen Zentrifugengläser auf einer Tischplatte. Wenn keine Aggregate von SRBC mehr sichtbar sind, schichtet man die 5 ml Rosetten-Suspension vorsichtig auf 5 ml Ficoll-Lösung und zentrifugiert in silikonisierten Zentrifugenröhrchen 30 Minuten bei 350 g. Der über dem Separationsmedium befindliche "Ring" besteht hauptsächlich aus den nicht Rosetten bildenden B-Lymphocyten. Die rosettenbildenden T-Lymphocyten bilden zusammen mit den überschüssigen SRBC das Pellet. Die B-Lymphocyten können nun mit einer nicht zu engen Pipette ohne Kontamination mit dem Separationsmedium einfach entnommen werden. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 500 g werden sie abschließend mit Hank'scher Lösung zweimal für 10 Minuten bei 350 g gewaschen. Um aus dem Sediment die T-Lymphocyten zu erhalten, müssen die SRBC erst wieder lysiert werden. Dazu suspendiert man das Sediment in 4 ml Hank'scher Lösung und gibt 2 ml NH_4Cl -Lösung zu. Nach kräftigem Suspendieren verdünnt man nochmals mit 5 ml Hank'scher Lösung und zentrifugiert 10 Minuten bei 350 g. Dann wäscht man noch zweimal für 10 Minuten bei 350 g mit Hank'scher Lösung. Die so gewonnenen T-Lymphocyten können nun kultiviert werden.

3.1.3. Buffy-Coat

Bei der sog. Buffy-Coat-Technik (BC) werden nur die Erythrocyten von den übrigen geformten Blutbestandteilen abgetrennt. Die folgende Aufstellung zeigt die unterschiedliche Effizienz der verschiedenen Methoden zur Leukocytenanreicherung. Es werden bei allen Methoden aus der Gruppe der kernhaltigen Blutbestandteile nur die Leukocyten betrachtet.

Ansatz 1:

5 ml Vollblut werden in eine 10 ml Spritze aufgezogen, der Kolben bei der 10 ml-Marke arretiert und die Spritze 3 Stunden unter einem Winkel von 45° gelagert (Δ lg-Sedimentation). Dabei ergab sich eine Ausbeute von $2,4 \cdot 10^6$ Leukocyten in 2 ml Plasma.

Ansatz 2:

5 ml Vollblut werden 10 Minuten bei 60 g im silikonisierten Zentrifugenglas zentrifugiert. Die Ausbeute betrug $6 \cdot 10^6$ Leukocyten in 1,25 ml Plasma.

Ansatz 3:

5 ml Vollblut werden vorsichtig auf 3 ml Ficoll von 20° C geschichtet und 30 Minuten bei 350 g im silikonisierten Glas zentrifugiert. Dieses Verfahren ergab $2,8 \cdot 10^6$ Leukocyten in 3 ml Plasma.

Ansatz 4:

5 ml Vollblut werden im Verhältnis 1:1 mit Hank'scher Lösung verdünnt und auf 10 ml Ficoll-Lösung geschichtet. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 350 g betrug die Leukocyten-Ausbeute in 8 ml Überstand aus 5 ml Hank'scher Lösung und 3 ml Plasma $3 \cdot 10^{-6}$.

Ein Vergleich der Leukocyten-Ausbeute aus jeweils 5 ml Vollblut zeigt, daß die größte Zahl nach 30minütiger Zentrifugation bei 60 g zu erhalten war. Somit war Ansatz 2 die Methode der Wahl um im Gegensatz zu Vollblutkulturen einerseits und reinen T-Lymphocyten-Kulturen andererseits, zu weitgehend erythrocytenfreien Leukocytenkulturen zu gelangen.

Zur Gewinnung von reinen T-Zellpopulationen erwies sich die Rosettentechnik mit anschließender Zentrifugation der Suspension aus rosettenbildenden und nicht Rosetten bildenden Zellen über Ficoll als die bessere Methode,

da bei Filtration durch Nylon-Wolle die T-Zell-suspension (Eluat) mit durchschnittlich 10% B-Zellen kontaminiert war.

3.2. Kulturbedingungen

Die bei der Vollblutkultur routinemäßig angewandte Mitogenkonzentration von 0.13 ml PHA-M in 5 ml Kulturflüssigkeit (Ampulleninhalt nach Vorschrift in 5 ml Aqua dest. gelöst) erwies sich in erythrocyten-freien 48 Stunden-Kulturen als ungeeignet, da nur geringe Mitoseindices auftraten. Andererseits zeigten PWM-stimulierte Vollblutkulturen nach 48 Stunden Kulturzeit noch keine Mitosefiguren.

Nach Trennung von B- und T-Lymphocyten durch die Rosettentechnik mit anschließender Ficoll-Trennung wurde versucht, diese beiden Populationen getrennt zu stimulieren. Dazu wurden 12 Versuche mit unterschiedlichen PWM und PHA-M Konzentrationen durchgeführt. In Kulturen in die nur B-Lymphocyten eingesetzt worden waren, konnte selbst bei einer Ausdehnung der Kulturzeit auf 96 Stunden weder mit PWM noch PHA-M oder -P eine mitogene Transformation beobachtet werden. Chromosomenanalysen in reinen B-Zellfraktionen konnten somit nicht durchgeführt werden.

T-Lymphocyten waren mit PWM nicht stimulierbar, jedoch mit PHA-M. Höhere Mitoseraten ergaben sich in Kulturen, die mit PHA-P stimuliert worden waren, wobei das PHA-P zuerst nach Vorschrift in 5 ml Aqua dest. aufgelöst und dann mit 30% McCoy-FCS verdünnt wurde. Versuche, in denen unterschiedliche Verdünnungsgrade im Bereich von 1:10 bis 1:1000 getestet wurden, führten bei der Verdünnungsstufe 1:100 zu den besten Ergebnissen.

3.3. Cytogenetische Befunde

3.3.1. Strahlenexposition

Zur Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit der durch BC- und Rosettentechnik gewonnenen verschiedenen Zellfraktionen, wurden insgesamt 4000 Zellen cytogenetisch analysiert. Bei jedem Trennverfahren gab es Ansätze bei denen entweder Vollblut vor der Trennung oder aber die einzelnen Zellfraktionen nach erfolgter Trennung bestrahlt wurden:

S = Standardbedingungen

Bestrahlt: 1 ml Vollblut

Kultiviert: 2 x 0.5 ml Vollblut in standardisiertem Kulturansatz

L = Zellen des Buffy-Coats

Bestrahlt: 5 ml Vollblut

Kultiviert: Zellen des BC in 2 x 0.5 ml Plasma
in standardisiertem Kulturansatz

XL = Zellen des BC

Bestrahlt: Zellen des BC in 1 ml Plasma

Kultiviert: Zellen des BC in 2 x 0.5 ml Plasma
in standardisiertem Kulturansatz

T = T-Lymphocyten

Bestrahlt: 20 ml Vollblut

Kultiviert: T-Lymphocyten in 2 x 0.5 ml F 10-Medium
in standardisiertem Kulturansatz

XT = T-Lymphocyten

Bestrahlt: T-Lymphocyten in 1 ml F 10-Medium

Kultiviert: T-Lymphocyten in 2 x 0.5 ml F 10-Medium
in standardisiertem Kulturansatz

Präparation	Dosis R	U- Zellen pro Zelle		S- Zellen %	Aberrationen pro Zelle							
		%	gaps		Chromatid- brüche	acentr. Fig.	minutes	R _C	R _O	DIC	ATYP	Ex
S	50	2	0.020	10.5	—	0.005	—	0.005	—	0.040	0.005	0.005
T		2.5	0.025	5	—	0.020	—	—	0.005	0.020	—	—
L		1	0.010	8	—	0.035	—	—	—	0.045	0.005	—
XT		3.5	0.050	11	—	0.065	0.005	—	0.005	0.045	0.010	0.005
XL		1.5	0.025	10.5	—	0.045	0.005	—	0.005	0.050	—	—
S	100	1	0.020	21.5	—	0.115	0.020	0.005	0.010	0.105	0.005	0.005
T		1	0.015	12	0.010	0.045	0.005	—	0.005	0.065	0.005	0.005
L		1.5	0.020	15	—	0.055	0.015	—	0.005	0.085	—	—
XT		2	0.030	21.5	—	0.160	0.005	—	0.005	0.095	—	—
XL		1	0.015	19	—	0.060	0.015	—	0.005	0.135	0.015	—
S	200	0	0.010	53.5	0.005	0.250	0.030	0.005	0.020	0.365	0.015	—
T		3	0.040	46.0	0.005	0.410	0.035	0.005	0.035	0.290	0.005	—
L		0	0.010	41.5	—	0.300	0.005	0.010	0.010	0.360	0.015	—
XT		0	0.020	48.5	0.005	0.350	0.040	0.005	0.025	0.295	0.015	—
XL		1.5	0.025	40.5	0.005	0.135	0.020	0.005	0.005	0.360	0.005	—
S	400	0	0.005	93.5	0.015	1.440	0.055	0.030	0.010	1.165	0.025	—
T		2.5	0.035	61.5	0.010	0.530	0.020	0.005	0.010	0.620	0.010	—
L		0	0.015	93.0	—	1.510	0.060	0.050	0.030	1.235	0.005	—
XT		0	0.050	87.5	—	0.835	0.160	0.010	0.065	0.995	0.025	—
XL		0	0.005	89.0	—	0.575	0.105	0.145	0.015	1.160	0.030	—

Tabelle 2: Häufigkeit verschiedener Zell- und Aberrationstypen in den einzelnen Präparationen nach Bestrahlung. Für jeden Ansatz wurden jeweils 200 Zellen ausgewertet. Abkürzungen siehe S. 6-7 und 17.

R_C: Ringchromosomen; R_O: Acentrische Ringe; DIC: Dicentrische Chromosomen;
ATYP: Atypische Chromosomen; Ex: Chromatidaustausch.

Präparation	Dosis (R)	Dicentrische Chromosomen pro Zelle					Mittlere Zahl DIC/Zelle	Relative Varianz	Goodness of fit	
		0	1	2	3	4	5		u	p
S	50	192	8				0.040	0.965	-0.349	0.726
	100	180	19	1			0.105	0.995	-0.050	0.960
	200	135	58	6	1		0.365	0.887	-1.128	0.260
	400	54	82	45	14	5	1.170	0.838	-1.621	0.105
L	50	191	9				0.045	0.960	-0.399	0.760
	100	183	17				0.085	0.920	-0.798	0.425
	200	135	56	9			0.370	0.878	-1.218	0.225
	400	56	76	40	21	7	1.235	0.944	-0.560	0.575
XL	50	190	10				0.050	0.950	-0.499	0.617
	100	175	23	2			0.135	1.018	0.180	0.857
	200	138	52	10			0.360	0.922	-0.779	0.436
	400	57	75	49	16	3	1.160	0.826	-1.741	0.081
T	50	196	4				0.020	1.000	0.000	1.000
	100	188	11	1			0.065	1.094	0.938	0.350
	200	158	31	8	2		0.290	1.476	4.751	<0.001
	400	112	65	16	6	1	0.600	1.139	1.388	0.164
XT	50	191	9				0.045	0.955	-0.449	0.653
	100	181	19				0.095	0.910	-0.898	0.369
	200	149	43	8			0.295	0.981	-0.190	0.849
	400	62	93	31	11	3	1.000	0.824	-1.760	0.078

Tabelle 3: Interzelluläre Verteilung der dicentrischen Chromosomen in verschiedenen Präparationen nach Röntgenbestrahlung.

Präparation	Goodness-of-fit				
	$\alpha \cdot 10^{-3}$	$\beta \cdot 10^{-6}$	χ^2	FG	P
S	0.60 ± 0.007	5.82 ± 0.32	0.30	3	0.95
L	0.44 ± 0.18	6.63 ± 0.77	3.63	3	0.30
XL	0.74 ± 0.042	5.43 ± 0.18	0.04	3	0.99
T	0.93 ± 0.01	1.48 ± 0.09	7.39	3	0.07
XT	0.47 ± 0.08	5.07 ± 0.37	0.19	3	0.98

Tabelle 4: Parameter der Dosis-Wirkungsbeziehung $y = c + \alpha D + \beta D^2$ für dicentrische Chromosomen in verschiedenen Präparationen nach Röntgenbestrahlung ($c = 0$).

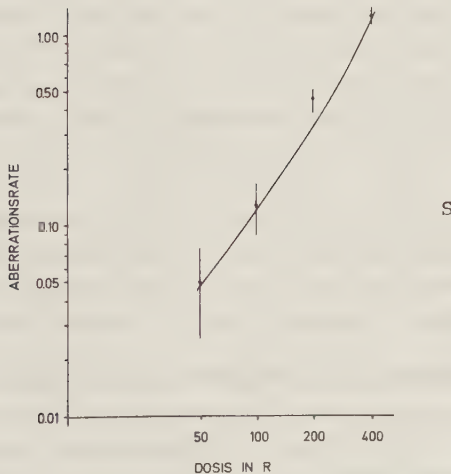
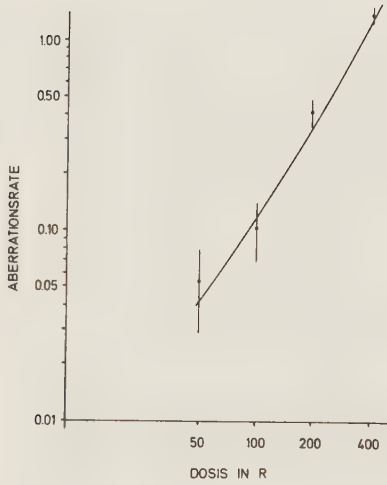
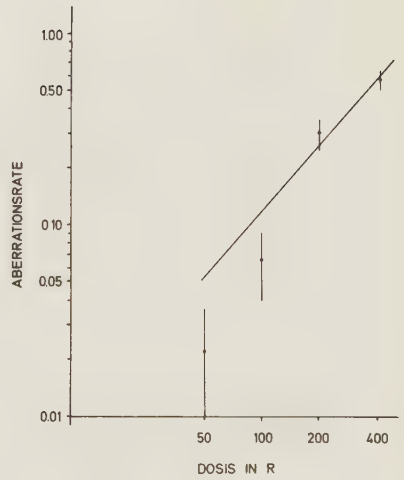


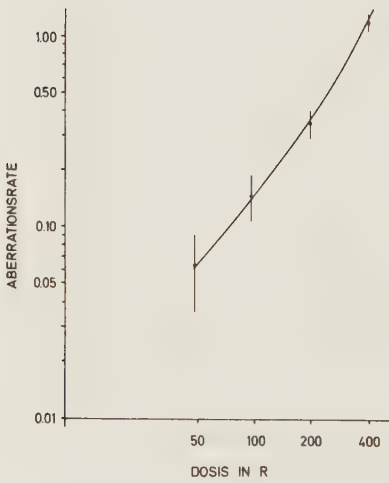
Abbildung 1: Dosis-Wirkungsbeziehung für dicentrische Chromosomen in verschiedenen Präparationen nach Bestrahlung mit 220 kV Röntgenstrahlen.



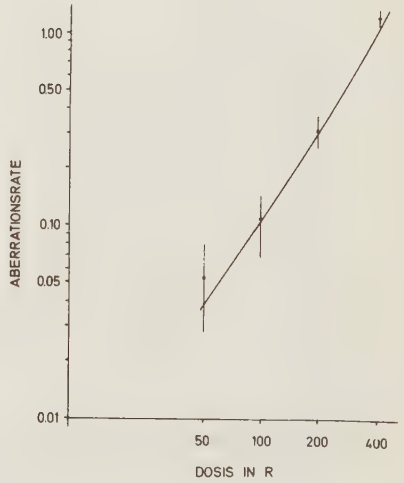
L



T



xL



xT

Abbildung 1: Fortsetzung

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Chromosomenanalyse nach Bestrahlung mit 220 kV Röntgenstrahlen. Pro Zellpräparation und Dosis wurden 200 Zellen ausgewertet und sämtliche Aberrationen registriert. Die Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen wurde nur für dicentrische Chromosomen durchgeführt, da dieser Aberrationstyp für eine cytogenetische Dosimetrie benutzt wird. Gründe hierfür sind deren geringe Frequenz in Kontrollansätzen (sie liegt z.B. in unserem Labor bei 0.3 %) sowie die Tatsache daß sie eindeutig erkennbar sind und ihr Entstehungsmechanismus bekannt ist. Außerdem ist sowohl ein Vergleich mit früher erhobenen Befunden nach Röntgenbestrahlung als auch mit den BLM-Daten nach Exposition in der G₀-Phase des Zellzyklus möglich.

Die Analyse der interzellulären Verteilung (Tabelle 3) der dicentrischen Chromosomen ergibt in allen Zellpräparationen für jede Dosis (Ausnahme: Präparation T, 200 R) eine relative Varianz (Varianz: Mittelwert) um 1.0 und ist somit mit einer Poisson-Verteilung zu vereinbaren. Die Güte der Anpassung wurde mit einem Test geprüft, der von RADHAKRISHNA RAO und CHAKRAVARTI (1956) entwickelt und durch SAVAGE (1970) eingeführt wurde.

Das linear-quadratische Modell $y = c + \alpha D + \beta D^2$ ($c=0$) konnte den empirischen Daten am besten angepaßt werden (Tabelle 4). Abbildung 1 zeigt die entsprechenden Dosiswirkungskurven in verschiedenen Präparationen.

Mit Hilfe eines Identitätstests nach SCHNEEBERGER (1960) wurden die Dosiswirkungsbeziehungen der verschiedenen Versuchsansätze jeweils mit der für die Standardkultur ermittelten verglichen. Tabelle 5 zeigt, daß bei einem Signifikanzniveau von $P = 0.05$ nur die Dosiswirkungskurve für den Versuchsansatz T (Bestrahlung

von Vollblut, Trennung und anschließende Kultivierung der T-Lymphocyten) signifikant von der für die Standardkultur verschieden ist ($F_{2,4} = 48.17$).

Tabelle 5:

Versuchsansatz	L	XL	T	XT
$(F_{2,4}) \quad \vee$	0.81	2.25	48.17	4.26

3.3.2. Bleomycin-Behandlung

Für die Chromosomenanalyse nach BLM-Behandlung in verschiedenen, durch BC- und Rosettentechnik gewonnenen Zellfraktionen wurden insgesamt 5000 Zellen erfaßt. Die Versuchsansätze S, T, L, XT und XL waren analog zu denen der Bestrahlungsexperimente. Pro Ansatz und Dosis wurden jeweils 250 Zellen analysiert.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Chromosomenanalysen nach BLM-Behandlung im G_0 -Stadium des Zellzyklus. Auffällig war die Dominanz der Aberrationen vom Chromosomentyp, sowie das Auftreten stark geschädigter Zellen auch bei Behandlung mit relativ niedrigen BLM-Dosen. Die Chromosomenanalyse für eine Zelle mit multiplen Defekten ergab z.B. im einzelnen ein hexacentrisches, fünf tricentrische und sieben dicentrische Chromosomen, wobei jede Aberration individuell identifizierbar war (Abb. 2a). Entsprechend der Bewertung polycentrischer Chromosomen (Zahl der Centromere -1 = Zahl der dicentrischen Chromosomen) wurden hier 22 dicentrische Chromosomen angerechnet. Andere schwer gestörte Zellen

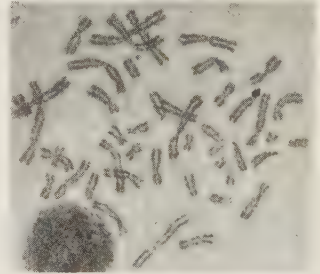
Präpara- tion	Konz. µg/ml	U- gaps Zellen %	S- gaps Zellen %	Aberrationen pro Zelle								
				Chromatid- brüche	acentr. Frg.	minutes	R _C	R _O	DIC	ATYP	Ex	
S	35	6.2	0.064	10.4	0.008	0.104	0.012	0.004	—	0.104	0.004	—
T		1.6	0.02	10.0	0.012	0.080	0.016	—	—	0.076	0.004	0.004
L		6.0	0.08	6	0.008	0.060	—	—	—	0.020	—	—
XT		1.6	0.028	7.6	—	0.068	—	—	—	0.040	0.004	—
XL		5.2	0.096	8.8	0.004	0.056	—	—	—	0.040	—	—
S	75	2.8	0.028	9.2	0.004	0.040	0.004	—	—	0.084	0.004	—
T		2.8	0.032	9.2	0.008	0.080	—	—	—	0.124	0.004	—
L		2.4	0.072	11.6	0.016	0.136	—	—	—	0.104	0.004	0.004
XT		0.8	0.008	9.6	0.004	0.072	—	—	—	0.048	—	—
XL		2.8	0.028	8.8	0.004	0.072	0.008	—	—	0.072	—	—
S	150	4.0	0.080	15.2	0.044	0.076	—	—	—	0.100	0.004	0.032
T		3.2	0.064	19.2	0.008	0.116	0.016	0.008	—	0.220	0.004	—
L		4.0	0.052	16.0	0.016	0.156	0.016	0.012	—	0.116	0.004	—
XT		0.8	0.016	16.0	—	0.092	0.016	—	0.016	0.096	—	—
XL		5.2	0.068	12.8	0.008	0.104	0.004	0.004	0.004	0.104	0.004	—
S	300	3.6	0.056	23.6	0.004	0.124	0.056	0.028	—	0.404	0.004	—
T		3.6	0.036	34.0	0.008	0.292	0.024	0.028	0.008	0.436	0.012	—
L		5.2	0.092	25.6	0.016	0.228	—	0.012	—	0.384	0.012	—
XT		0.8	0.020	30.8	—	0.188	0.012	0.008	—	0.160	0.024	0.008
XL		4.4	0.068	13.6	—	0.120	0.028	—	—	0.184	—	—

Tabelle 6: Häufigkeit verschiedener Zell- und Aberrationstypen in den einzelnen Präparationen nach BUM-Behandlung. Für jeden Ansatz wurden jeweils 250 Zellen ausgewertet. Abkürzungen siehe Tabelle 2.

konnten nicht voll analysiert werden (Beispiel Abb. 2 d). Sie wurden als S-Zellen bewertet. Die Störungen sind jedoch nicht in den Gesamtaberrationsraten berücksichtigt.



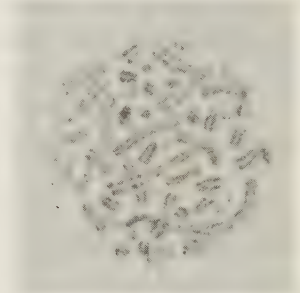
a



b



c



d

Abb. 2: Beispiele für S-Zellen mit multiplen Defekten nach Behandlung mit 300 μg BLM/ml.

a - c) voll analysierbare S-Zellen

d) nicht analysierbare S-Zelle

Die Analyse der interzellulären Verteilung dicentrischer Chromosomen ergab in 17 von 20 Fällen eine "over-dispersion" d.h. die relative Varianz war >1 (Tabelle 7). Im Vergleich zu Röntgenstrahlen entspricht die Verteilung hier einer negativ binomischen Verteilung.

Präpara- tion	Dosis µg/ml	Dicentrische Chromosomen pro Zelle													Mittlere Zahl Dic/Zelle	Relative Varianz	Goodness of fit		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			13	u	p
S	35	237	9	2				1	1							0.104	3.83	31.583	<0.001
	75	234	14	1	1											0.084	1.78	8.705	<0.001
	150	228	19	3												0.100	1.15	1.674	0.094
	300	206	29	7	2	2	1	1				1				0.404	7.28	70.129	<0.001
L	35	245	5													0.020	0.98	-0.223	0.820
	75	235	9	3	2			1								0.108	2.68	18.749	<0.001
	150	233	11	3	1	1										0.116	2.07	11.942	<0.001
	300	203	27	10	3	1	3	1	2							0.392	3.32	25.907	<0.001
XL	35	242	7	1												0.040	1.57	6.360	<0.001
	75	239	10							1						0.072	4.06	34.148	<0.001
	150	228	20	1	1											0.104	1.44	4.910	<0.001
	300	227	15	2	3		3									0.184	3.07	22.882	<0.001
T	35	242	5	1	1				1							0.072	4.06	34.148	<0.001
	75	235	9	3	2					1						0.124	4.38	37.723	<0.001
	150	222	20	5				1	1			1				0.220	4.29	36.725	<0.001
	300	197	40	5	3	1	2	1						1		0.384	3.61	29.144	<0.001
XT	35	243	5	1	1											0.040	1.77	8.592	<0.001
	75	240	8	2												0.048	1.29	3.236	<0.001
	150	230	18		2											0.096	1.41	4.575	<0.001
	300	214	33	2	1											0.160	1.09	1.004	0.315

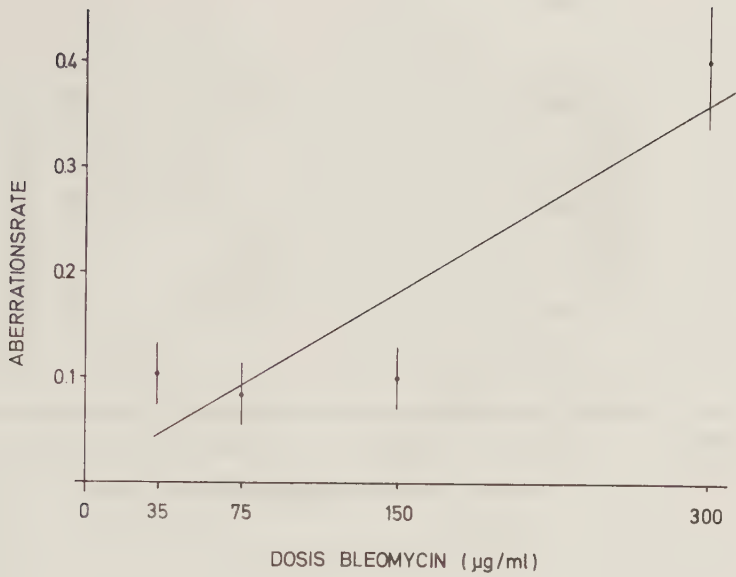
Tabelle 7: Interzelluläre Verteilung der dicentrischen Chromosomen in verschiedenen Präparationen nach BLM-Behandlung.

Präparation	Goodness-of-fit				
	$a \cdot 10^{-3}$	$b \cdot 10^{-3}$	χ^2	df	P
S	4.59 ± 66.4	1.20 ± 0.38	7.300	3	0.0
L	-28.2 ± 41.95	1.33 ± 0.24	1.800	3	0.6
XL	26.1 ± 4.77	0.53 ± 0.03	0.052	3	0.9
T	35.8 ± 6.19	1.17 ± 0.03	0.009	3	0.9
XT	20.2 ± 5.92	0.47 ± 0.03	0.108	3	0.9

Tabelle 8: Parameter der Dosis-Wirkungsbeziehung $Y = a + bD$ für dicentrische Chromosomen in verschiedenen Präparationen nach BLM-Behandlung.

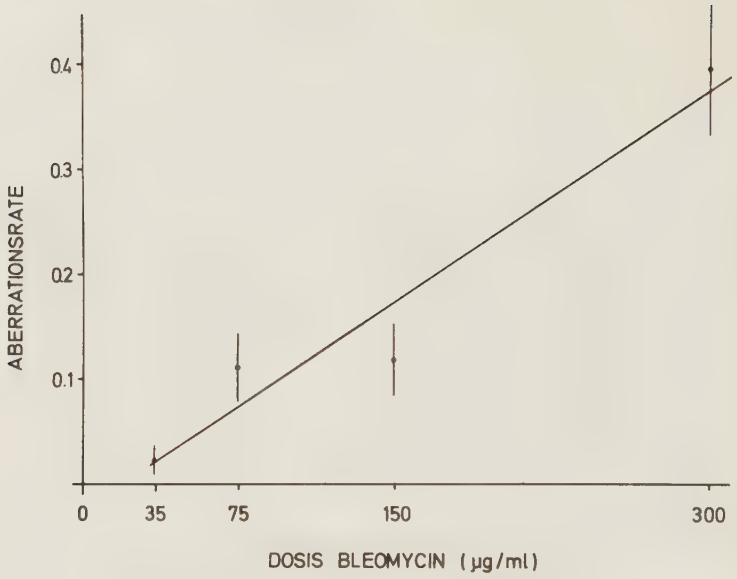
Die Güte der Anpassung wurde mit analogen statistischen Verfahren wie bei den Bestrahlungsexperimenten geprüft.

In den verschiedenen Präparationen ergab sich für dicentrische Chromosomen eine lineare Regression mit der Dosis ($y = a + bD$) bei einer Signifikanz von $P = 0.05$ (Tabelle 8). Die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven zeigen Abbildung 3.

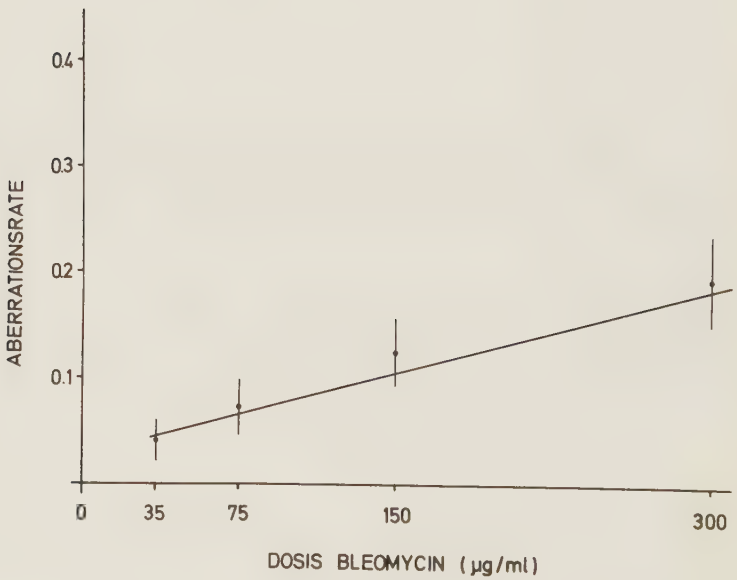


S

Abbildung 3: Dosis-Wirkungsbeziehung für dicentrische Chromosomen in verschiedenen Präparationen nach BLM-Behandlung.

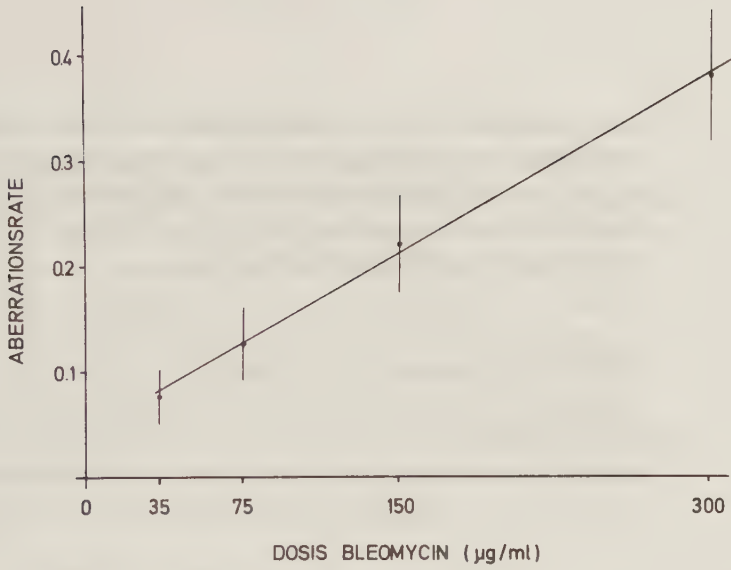


L

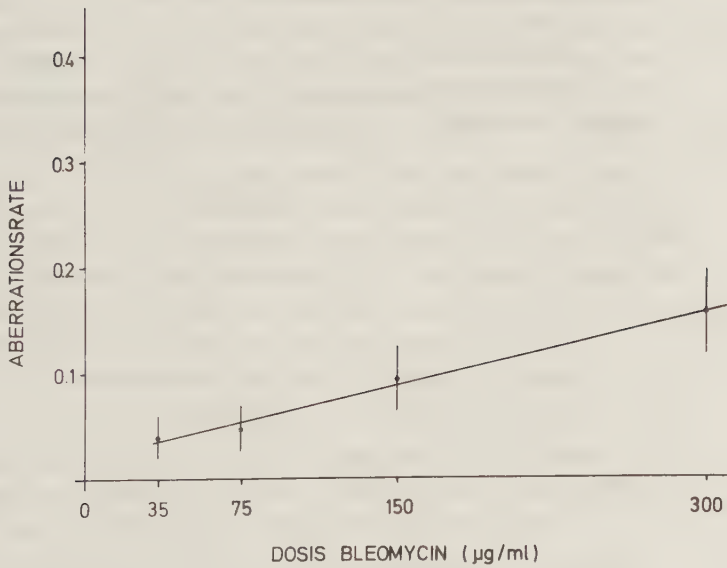


xL

Abbildung 3: Fortsetzung



T



xT

Abbildung 3: Fortsetzung

Der Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen der verschiedenen Versuchsansätze mit der Standardkultur wurde analog wie bei den Bestrahlungsexperimenten durchgeführt. Bei dem Signifikanzniveau von $P = 0.05$ ergaben sich nach BLM-Behandlung keine Unterschiede.

Tabelle 9:

Versuchsansatz		L	xL	T	xT
$(F_{2,4})$					
	χ^2	0.08	4.57	0.03	4.27

Da die lineare Anpassung aber gerade für "S" sehr schlecht ist, wurde zusätzlich ein Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Versuchsansätze xL und xT mit L und T durchgeführt, die eine bessere Anpassung aufweisen.

Bei einem Signifikanzniveau von $P = 0.05$ ergeben sich für xL und xT Unterschiede in der Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl im Vergleich zum Ansatz L als auch zum Ansatz T.

(xL/T: $\chi^2=74,25$; xT/T: $\chi^2=39.56$; xL/L: $\chi^2=9.56$; xT/L: $\chi^2=8.41$)

4. Diskussion

Die Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit war zweigeteilt. Zum einen sollte eine Methodik erarbeitet werden, die es ermöglicht aus kleinen Mengen menschlichen Vollbluts Lymphocytenfraktionen mit einer ausreichenden Zahl von Zellen zu isolieren, die nach erfolgter Trennung noch cytogenetisch analysierbar sein mußten. Zum anderen sollten Dosis-Wirkungsbeziehungen sowohl nach Bestrahlung als auch nach Chemikalienbehandlung der verschiedenen Zellpräparationen aufgestellt werden um eventuell vorhandene Empfindlichkeitsunterschiede cytogenetisch quantifizieren zu können.

4.1. Analyse der Trennverfahren

Im wesentlichen werden drei verschiedene Parameter der Zellen für physikalische Zellfraktionierungen verwendet.

- a) Volumen (Fraktionierung durch Sedimentation)
- b) Dichte (Fraktionierung im Dichtegradienten)
- c) Elektrische Oberflächenladung (Fraktionierung durch Elektrophorese)

Da die meisten Lymphocytenseparationen an tierischen Zellen durchgeführt wurden, muß zunächst geklärt werden ob das betreffende Verfahren auch auf Humanlymphocyten anwendbar ist und ob die Zellen nach der sich anschließenden Kultur cytogenetisch analysierbar sind.

Um eine Trennmethode geeignet erscheinen zu lassen, mußte sie also folgende Anforderungen erfüllen:

1. Sie mußte mit kleinen Mengen Vollblut auskommen, da mit jeder Blutabnahme mehrere Versuche durchgeführt werden sollten (Dosis-Wirkungskurven!).
2. Sie mußte mit zeitlich und instrumentell geringem Aufwand durchführbar sein.

3. Sie durfte die Lymphocyten nicht so schädigen, daß diese in Kultur nicht mehr mitogen stimulierbar waren.
4. Sie durfte keine Substanzen beinhalten, die Chromosomenaberrationen hervorrufen.

Es gibt zwei technisch und finanziell aufwendige Methoden zur Trennung von Zellpopulationen. Mit dem von HERZENBERG et al. 1974 entwickelten Zellseparator (1976) können mit fluoreszenz-markierten Antikörpern beladene B- oder T-Lymphocyten mit einem elektrischen Feld getrennt werden. EPSTEIN et al. (1974) berichten, daß die Aufarbeitung einer menschlichen Blutprobe von der Blutabnahme über Ficoll-Trennung, Fluoreszenzmarkierung, Auftrennung im Zellseparator und Vorbereitung für die Zellkultur 40 Stunden beansprucht.

ZEILLER und Mitarbeiter (1972) waren mittels der trägerfreien Ablenkungselektrophorese in der Lage B- und T-Lymphocyten der Maus aus Knochenmark, Milz und Thymus aufzutrennen. wobei die T-Zellen hohe elektrophoretische Beweglichkeit zeigten, während die B-Zellen langsamer wanderten.

Da aber Humanlymphocyten gegenüber elektrischen Feldern wesentlich empfindlicher sind als Nagerzellen, würden diese Trennverfahren sehr große Blutmengen erfordern, um eine ausreichende Zahl von Zellen für eine erfolgreiche Lymphocytenkultur zu erhalten. Zudem scheint selbst bei Nagerzellen nicht eindeutig geklärt zu sein, ob Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit eventuell nur auf unterschiedlichen Reifezuständen ein und derselben Zelle oder auf tatsächlichen ontogenetischen Unterschieden basieren (105).

Präparative Trennungen von Humanlymphocyten des peripheren Blutes mit der trägerfreien Ablenkungselektrophorese

sind bis jetzt nur STEIN (1975 a,b, 1976) gelungen, wobei allerdings nur indirekte Beweise für eine Trennung in T- und B-Lymphocyten sprechen. Ähnliches gilt für die von SABOLOVIC et al. (1972), WIIG und THUNOLD (1973), CHOLLET et al. (1977) und SERROU et al. (1977) erzielten Ergebnisse bei nu/nu-Mäusen und Zellen von Patienten mit speziellen T- oder B-Zell-Leukämien, die mit einer von BANGHAM et al. (1958) entwickelten Mikro-Elektrophoreseapparatur bzw. im Cytopherometer erzielt wurden.

Die so getrennten Zellen sind jedoch nicht mehr für eine Lymphocytenkultur mit anschließender cytogenetischer Analyse geeignet. Die Fraktionierung im Dichtegradienten, die für Blutzellen von Nagern recht exakte Trennungen liefert (85, 86, 87), kann auf menschliche T- und B-Lymphocyten nicht angewandt werden, da diese zu geringe Unterschiede in Dichte und Größe aufweisen (22). In der von BARKER et al. (1975) beschriebenen Methode werden Gewebekultur-Platten mit Immunglobulin beschichtet und anschließend mit Anti-Immunglobulin-Antiserum behandelt. Wenn eine Lymphocytensuspension in den so vorbehandelten Gefäßen zentrifugiert wird, sollen sich die B-Lymphocyten an den Oberflächen festsetzen, während die T-Lymphocyten keine Adhäsion zeigen. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit schien es am aussichtsreichsten zuerst einmal zwei der weniger aufwendigen Trennverfahren zu optimieren. Es wurde dazu die Trennung über Nylon-Wolle und die Rosettentechnik mit anschließender Ficoll-Trennung ausgewählt, da diese weder mit elektrischen Feldern noch mit Antikörpern arbeiten und das Separationsmedium Ficoll bzw. Lymphoprep vorher auf seine Kompatibilität gegenüber Lymphocyten ausgetestet worden war.

4.1.1. Nylon-Wolle-Säule

Nachdem erkannt worden war, daß in erythrocytenfreien Blutzellsuspensionen nach Durchgang durch eine Säule von Glaskugeln oder Nylonwolle ein verändertes Verhältnis der einzelnen Zellarten zueinander vorlag (38, 52, 60, 68), wurden die verschiedensten Versuche unternommen, diese Veränderungen genauer zu definieren und reproduzierbar zu machen (18, 29, 48, 63, 95). Es erwies sich, daß T-Lymphocyten die Nylon-Wolle passieren, während die B-Lymphocyten an den Nylonfasern hängen bleiben. Die Eluierbarkeit der T-Lymphocyten mit Medium nach Inkubation bei 37° darf als gesichert angenommen werden. Es liegen hierfür sowohl strukturelle als auch funktionelle Beweise vor (29, 95). Widersprüchlich sind die Angaben über die Möglichkeit adhärierter B-Lymphocyten aus der Nylon-Wolle zu gewinnen. Einige Autoren (18, 95) geben an, nach erfolgter Eluierung der T-Zellen durch mechanisches Zerkleinern und Auspressen der Nylon-Wolle reine B-Zell-Fraktionen gewonnen zu haben, andere bestreiten diese Möglichkeit (11). In eigenen Versuchen konnten im Durchschnitt nur 57 % der nach Zerkleinerung und Auspressen der Nylon-Wolle erhaltenen Zellen durch Immunfluoreszenz als B-Lymphocyten identifiziert werden. Die T-Zellsuspension im Eluat war zudem mit durchschnittlich 10% B-Zellen kontaminiert. Die Passage von Lymphocytensuspensionen durch Nylon-Wolle ist im Hinblick auf B- und T-Lymphocyten somit nur geeignet eine selektive Anreicherung der T-Zellen herbeizuführen. PAPAMICHAIL et al. (1976) geben den Reinheitsgrad mit 97.6% an, CHOLLET et al. (1976) mit 92%, wobei die Rosettenbildung mit SRBC als T-Zell-Marker benutzt wurde. Es darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß bei der Anreicherung von T-Zellen mit Nylon-Wolle auch beträchtliche Mengen von T-Zellen in den Säulen hängen bleiben. Dies ist ein nicht unerheblicher Nachteil im

Hinblick auf die für cytogenetische Analysen notwendige Zellkultur.

Eine Arbeit über Chromosomenpräparationen von T- und B-Lymphocyten liegt von CARDILLO et al. (1978) vor. Sie benutzten eine modifizierte Form der Säulentrennung, die mit an Poly-methyl-acryl-Kugeln gebundene Immunglobuline arbeitet. Die Autoren schränken ein, "daß die durch Immunfluoreszenz zu erkennende B-Zellpopulationen nicht an allen Zellen Fluoreszenz aufwies, was auf Kontamination mit T-Zellen hindeutet. Die B-Zellpopulation kann jedoch als hoch angereichert betrachtet werden, da fast 50% aller beobachteten Zellen Fluoreszenz aufwiesen". Damit ist diese Methode auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragestellung nicht anwendbar.

4.1.2. Rosetten-Technik

Zur präparativen Trennung von T- und B-Lymphocyten hat sich die Rosetten-Methode als relativ einfache Technik erwiesen. Die Zellen werden dabei weder einem großen mechanischen Stress noch elektrischen Einwirkungen ausgesetzt, so daß gut reproduzierbare Resultate erzielt werden können. Ein Vergleich der Befunde verschiedener Arbeitsgruppen zeigt, daß sich mit der Rosettentechnik sehr reine T-Zellpopulationen herstellen lassen und die relative Ausbeute gut reproduzierbar ist.

Als erster berichtet ZAALBERG (1964) über Beobachtungen an Milzzellen von Mäusen, die mit SRBC immunisiert worden waren. Bei in vitro Inkubation dieser Milzzellen mit gewaschenen SRBC waren nach 2 Stunden bei 37° C die Milzzellen von dichten Lagen von SRBC umgeben. Allerdings konnte er bei nichtimmunisierten Milzzellen und bei Thymuszellen keine Bindung von SRBC feststellen.

BRAIN et al. (1970) fanden, daß bis zu 30 % der menschlichen Lymphocyten mit SRBC Rosetten bilden und nahmen an, daß dieses Phänomen auf einer Substanz beruht, die von einem Großteil der peripheren Lymphocyten gebildet wird und ähnlich pflanzlichen Lektinen mit Antigenen der SRBC reagiert. FRÖLAND (1972) wies den T-Zell-Charakter der rosettenbildenden Zellen auf verschiedenen Wegen nach. Nach Dichtegradientenzentrifugation von B-Lymphocyten und rosettenbildenden Zellen aus derselben Präparation waren Immunglobuline nur in der B-Zell-Fraktion zu erkennen. Bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie war die Fähigkeit zur Rosettenbildung stark eingeschränkt. Bei schweren Hypogammaglobulinämien waren fast keine B-Lymphocyten vorhanden, während die Zahl der rosettenbildenden Zellen normal war. Außerdem wies er durch direkte Immunfluoreszenz nach, daß nur Ig-negative Lymphocyten Rosetten bilden können und fand, daß Anti-Ig-Antiserum die Rosettenbildung nicht unterdrückt. WYBRAN et al. (1972) bestimmten den T-Zell-Charakter durch Untersuchungen an Organen menschlicher Föten. Im Thymus war die Zahl der rosettenbildenden Zellen am größten, im Knochenmark am geringsten. Bei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom war die Fähigkeit zur Rosettenbildung stark vermindert. JONDAL et al. (1972) sahen die T-Zell-Natur der rosettenbildenden Lymphocyten durch Untersuchungen der Ig-Determinanten aus Blut- und Thymuslymphocyten von Normalpersonen und Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie bestätigt, während LAY et al. (1971) feststellen konnten, daß bei Verwendung von Thymocyten die Zahl der Rosetten wesentlich größer war als bei peripheren Lymphocyten. Weiter spricht für die Rosettenbildung durch T-Lymphocyten die Tatsache, daß sowohl in eigenen Versuchen als auch bei anderen Autoren (55, 66) die Stimulation nicht Rosetten bildender Lymphocyten mit dem T-Zell-Mitogen PHA nicht möglich war, während die rosettenbildenden Zellen gut stimulierbar waren.

Eines der größten Probleme bei der Rosettentechnik ist die Beständigkeit der Bindung zwischen T-Lymphocyten und SRBC. Um möglichst stabile Rosetten zu erhalten sind mehrere Bedingungen zu erfüllen:

1. SRBC sollten weder am Tage der Abnahme noch später als 14 Tage danach benutzt werden.
2. Das Verhältnis SRBC zu Lymphocyten soll 20:1 nicht unterschreiten. Ein größeres Verhältnis als 50:1 sollte ebenfalls vermieden werden, da nach BACH (1973) ein Zuviel an SRBC den notwendigen engen Kontakt zwischen aktiven SRBC und Lymphocyten aus räumlichen Gründen behindert.
3. Einer Inkubation bei 37° C muß eine mindestens 30minütige Aufbewahrung der abzentrifugierten Lymphocyten-SRBC-Suspension bei 4° C folgen.
4. Nach Ausbildung der Rosetten sollen diese in mindestens 25% FCS aufbewahrt werden.
5. Die SRBC sollen mit Neuraminidase vorbehandelt werden.

Die Mehrzahl der Autoren, die sich mit der Neuraminidase-wirkung auf die Rosettenbildung befaßten (34, 62, 80, 97, 103, 102) fand durchwegs eine Erhöhung der Rosettenbildungsrate bzw. eine Stabilisierung der Rosetten, wenn sie entweder die Lymphocyten oder die SRBC mit Neuraminidase vorbehandelt hatten. WHITTINGHAM und MAC KAY (1973) fanden jedoch nach Inkubation von Thymocyten von Mensch und Schwein mit Neuraminidase eine Unterdrückung der Rosettenbildung, die sie auf Zerstörung der Sialin-Säure-Moleküle an den Zelloberflächen zurückführten, denen sie eine Rezeptorfunktion bei der Rosettenbildung zuschreiben. In den eigenen Versuchen wurden nur die SRBC mit Neuraminidase behandelt. Damit sollte einer Veränderung der Zelloberfläche der Lymphocyten vorgebeugt werden, die sich

auf die Kultivierbarkeit der Zellen hätte auswirken können. Außerdem vermuten BENTWICH et al. (1973 b), daß nach Behandlung der Lymphocyten mit Neuraminidase auch B-Lymphocyten so verändert werden, daß sie Rosetten bilden können. Über den Wirkungsmechanismus der Neuraminidase ist man sich noch nicht klar. POSCHMANN und FISCHER (1974) nehmen an, daß Rezeptoren die vorher verdeckt waren, - sogenannte Kryptantigene -, demaskiert und damit zugänglich werden. Die Mehrzahl der Untersucher (34, 62, 77, 96, 107) hat Hinweise dafür, daß durch Abspaltung der Sialinsäure-Reste von der Zelloberfläche die negative Ladung der Zellen herabgesetzt wird, wodurch die elektrostatische Abstoßung zwischen Lymphocyten und SRBC vermindert und der Kontakt zur Bildung von Rosetten leichter hergestellt wird. ZEILLER und SCHINDLER (1974) konnten die Änderung der Oberflächenladung mit der trägerfreien Ablenkungselektrophorese direkt nachweisen. Die Verwendung von FCS wirkt sich nach WYBRAN et al. (1973) positiv auf die Rosettenbildung aus. Jedoch gibt es auch bezüglich der Wirkung von FCS auf die Stabilität der Rosetten einen negativen Befund. ROSZMAN et al. (1977) fanden bei Inkubation der Lymphocyten bei 37° in FCS eine Abnahme der Fähigkeit mit SRBC Rosetten zu bilden. Das dürfte jedoch eher als Temperatureffekt zu deuten sein, denn auch ohne FCS wurden nach Vorinkubation bei 37° C geringere Rosettenzahlen von ihnen beobachtet. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die nach der Trennung von T- und B-Lymphocyten für cytogenetische Analysen notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Zellkultur am besten durch die Rosettentechnik zu erreichen sind. Rein physikalische Trennmethode sind nicht so wirkungsvoll wie Methoden, die auf Affinitäten der Zelloberfläche beruhen. Die für die Lymphocytenkultur interessanten T-Zellen lassen sich gut anreichern

und stellen dann eine relativ reine Population dar. Bei verschiedenen Autoren (1, 14, 16, 20, 61, 64, 92) liegen die Angaben über die Häufigkeit der T-Zellen zwischen 56 und 79 %, wobei die Kontamination mit B-Zellen unter 5 % lag. In den eigenen Versuchen ergab sich eine Ausbeute von 65 - 78 %.

4.1.3. Buffy-Coat

In der vorliegenden Arbeit wurden die geformten Blutbestandteile exklusive der Erythrocyten (BC) durch vorsichtige Zentrifugation für 30 Minuten bei 60 g gewonnen. Aus 5 ml Vollblut betrug dabei die höchste Leukocyten-Ausbeute $6 \cdot 10^6$ Zellen. Die gleiche Ausbeute erhielten MOORHEAD et al. (1960). Andere Autoren, die BC-Präparationen für cytogenetische Untersuchungen durchführten, geben entweder nur das Ausgangsvolumen an Vollblut (41, 78, 84), nur die Zellzahl pro Kulturansatz (70) oder aber weder Volumen noch Zellzahl an (56, 75). LUCHNIK (1975) verwendet zur besseren Sedimentation eine 10% Gelatine-Lösung, RICKINSON und ILBERY (1971) benutzen eine 6% Dextran-Lösung. KORENBERG (1979) gibt zwar an, daß in der Leukocytenkultur Ficoll-getrennte Zellen höhere Metaphaseraten zeigen, jedoch geht sie davon aus, daß Kulturen, die durch 1g-Sedimentation gewonnene Zellen enthalten, häufiger fehlschlagen. Dies kann durch die eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Außerdem verwendete KORENBERG RPMI-1640-Medium und kultivierte 72 - 96 Stunden.

Der Vorteil der Abtrennung von Leukocyten aus dem Vollblut, ohne Benutzung eines speziellen Trennmediums liegt darin, daß keine Zellverluste während des Trennverfahrens auftreten. Da nach erfolgter Trennung keine Waschprozesse nötig sind, können auch hier keine Zellen verloren gehen. Von den verschiedenen Methoden zur Gewinnung weitgehend erythrocytenfreier angereicherter Leukocytenfraktionen war die

einfache Zentrifugation für 30 Minuten bei 60 g am geeignetsten.

4.2. Kulturbedingungen

Dem Mitogen PHA, welches in ungetrennten Lymphocytenkulturen die höchsten Mitoseraten stimuliert, wird eine T-Zell-spezifische Wirkung zugeschrieben (35, 37, 47). Allerdings wurde in den meisten Fällen nicht angegeben, ob PHA-P oder PHA-M benutzt wurde. Über die mitogenen Wirkungen von PWM liegen sehr unterschiedliche Befunde vor. CHESS et al. (1974) untersuchten die Wirkung verschiedener Mitogene auf menschliche T- und B-Lymphocyten des peripheren Blutes. Sie fanden in getrennten B-Zellpopulationen Stimulation des H^3 -Thymidin-Einbaus durch PWM in 4-Tage-Kulturen. MELLSTEDT (1975) berichtet ebenfalls über PWM-Stimulation von B-Lymphocyten des Blutes. GREAVES et al. (1974) sowie GEHA et al. (1974) konnten mit PWM B-Lymphocyten aus Mandeln und Milz zur Aufnahme von 3H -markiertem Thymidin stimulieren. EPSTEIN et al. (1974) fanden bei menschlichen B-Lymphocyten eine Stimulation des Thymidin-Einbaus durch PWM erst nach fünf bis sieben Tagen. In der vorliegenden Arbeit konnte in reinen B-Zell-Fraktionen des menschlichen peripheren Blutes mit PWM in keinem Versuchsansatz eine mitotische Aktivität induziert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis vieler anderer Arbeiten (21, 32, 36, 46, 47) in denen darauf hingewiesen wird, daß eine B-Zell-Antwort auf mitogene Stimulation stets T-Zell abhängig ist. Gegen die vielfach gemachte Annahme, PHA sei ein spezifisches T-Zell-Mitogen und PWM ein spezifisches B-Zell-Mitogen müssen eine Reihe von Einwendungen gemacht werden.

1. Die Aussage trifft für Lymphocyten von Nagern zu, Humanlymphocyten zeigen jedoch ein anderes Reaktionsmuster.
2. Was für Lymphocyten aus Thymus, Milz und Mandeln gilt, ist nicht auch für Zellen des peripheren Blutes notwendigerweise richtig.
3. Stimulationen in ungetrennten Zellpopulationen lassen keine direkten Rückschlüsse auf die Wirkung in getrennten Populationen zu.
4. Stimulation, gemessen als ^3H -Thymidin-Einbau ist nicht unbedingt gleichzusetzen mit Mitoseaktivität. So führen RINGDEN und MÖLLER (1976) an, daß man einige "B-Zell"-Mitogene nicht als Mitogene in dem Sinne ansehen könne, daß sie nur die DNA-Synthese und Mitose von B-Zellen induzieren. Stattdessen könnten sie die Zellen zur Synthese und Sekretion von Antikörpern aktivieren. Man beobachtet also ^3H -Thymidin Einbau, was zumindest in allen nicht-cytogenetischen Arbeiten als Zeichen der Stimulation gewertet wird, findet aber keine Mitosen.
5. Bei der Behandlung von getrennten Populationen muß kontrolliert werden, wie sauber die Populationen voneinander getrennt sind. Der ursprüngliche Ansatz der eigenen Versuche, in Vollblutkulturen einmal mit PWM selektiv B-Zell-, zum anderen mit PHA T-Zell-Stimulierung zu erhalten, mußte fallengelassen werden, da die beiden Mitogene nicht streng spezifisch wirken. B- und T-Lymphocyten können, wenn auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß, jeweils durch beide Mitogene stimuliert werden. Die Gesamt-Stimulationsrate von T-Zellen durch PWM beträgt allerdings nur ein Viertel der durch PHA erreichbaren.

4.3. Strahlenempfindlichkeit

Aus Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf lymphatische Zellen ist zu entnehmen, daß B-Zellen im allgemeinen eine höhere Strahlenempfindlichkeit zeigen als T-Zellen. Die Ergebnisse wurden vor allem durch Analysen der Überlebensraten gewonnen.

So untersuchte PROSSER (1976) die Überlebensfähigkeit menschlicher T- und B-Lymphocyten nach 250 kV Röntgenbestrahlung mit Dosen von 25-1000 rad. Zur Charakterisierung der Populationen benutzte er die Eigenschaft der T-Lymphocyten, mit SRBC Rosetten zu bilden. Mit Hilfe einer von BIANCO et al. (1970) beschriebenen Methode konnten B-Lymphocyten an der Rosettenbildung mit Erythrocyten-Antikörper-Komplement erkannt werden. Unbestrahlte T-Lymphocyten waren nach 96 Stunden noch zu 50% vital, B-Lymphocyten jedoch nur zu ca. 20%. Nach 96 Stunden betrug die Überlebensrate der bestrahlten Zellen gegenüber unbestrahlten bei T-Lymphocyten für 100 rad 55%, für 200 rad 43%, für 400 rad 30%, bei B-Lymphocyten für 100 rad 17%, für 200 rad 12% und für 400 rad 8%. KWAN und NORMAN (1977) konnten nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung von T- und B-Lymphocyten aus menschlichen Blut und Thymus identische Befunde für T-Zellen erheben. Nach 96 Stunden betrug die Überlebensrate der bestrahlten B-Zellen gegenüber unbestrahlten für 100 rad ca. 38%, für 200 rad 35% und für 400 rad 20%.

Abweichende Befunde von der einhelligen Meinung, daß T-Lymphocyten strahlenresistenter sind als B-Lymphocyten wurden nur an lymphoiden Zelllinien gewonnen. HAN et al. (1974) und DREWINKO et al. (1972 a) fanden nach Bestrahlung mit 250 kV-Röntgenstrahlen bei den B-Zellen höhere Überlebensraten.

Das Auftreten verschiedener Lymphocytenpopulationen mit unterschiedlich hohen strahleninduzierten Aberrationsraten wird auch aufgrund cytogenetischer Untersuchungen postuliert.

BENDER und BREWEN (1969) fanden in menschlichen Lymphocytenkulturen nach Röntgenbestrahlung zwei Maxima der Aberrationshäufigkeit, eines nach 54 Stunden und eines nach 78 Stunden. Aufgrund der Beobachtung, daß in manchen Zellen mit asymmetrischen Austauschprozessen die dazugehörigen acentriscen Fragmente fehlten, nahmen sie an, daß diese Zellen bereits mehr als eine Teilung in der Kultur durchgeführt hatten. Mit Hilfe von Mitoseindex-Bestimmungen und autoradiographischen Analysen erklärten sie ihre Beobachtungen mit dem Vorhandensein von mindestens zwei Lymphocytenpopulationen, die sowohl in ihrer Strahlenempfindlichkeit als auch in der Zellzyklusgeschwindigkeit unterschiedlich sind.

STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) blockierten nach Röntgenbestrahlung menschlicher Lymphocyten den Übergang von der G_1 - in die S-Phase. Nach Aufhebung der Blockade zeigten die Zellen mit der kürzesten S + G_2 -Phase die höchste Rate an asymmetrischen Austauschfiguren. Zellen mit langer S + G_2 -Phase wiesen signifikant weniger Aberrationen auf. Da die interzelluläre Verteilung der dicentriscen Chromosomen einer Poisson-Verteilung entspricht, schließen die Autoren eine strahleninduzierte, selektive Mitoseverzögerung aus und erklären die signifikant verschiedenen Aberrationsraten mit unterschiedlich empfindlichen Lymphocytenpopulationen. Würden nämlich Zellen mit Aberrationen verzögert in die Mitose eintreten, müßte sich dies auch an einem verzögerten Anstieg des Mitoseindex bemerkbar machen. Dabei sollten Zellen mit zwei oder mehr

Aberrationen entsprechend am spätesten in die Mitose eintreten. Die interzelluläre Verteilung der Aberrationen müßte dann von einer Poisson-Verteilung abweichen.

DUDIN et al. (1974) fanden bei autoradiographischen Analysen in PHA-stimulierten Kulturen menschlicher Lymphocyten zwei Maxima der Mitosehäufigkeit und drei Maxima der DNA-Synthese zwischen 34 Stunden und 50 Stunden nach Kulturbeginn. Sie schlossen daraus auf zwei Lymphocytenpopulationen mit einem Mitosemaximum bei 44 Stunden bzw. 48 Stunden. Der dritte Gipfel in der DNA-Syntheserate sollte die zweite Syntheseperiode der ersten Population darstellen. Die gleiche Arbeitsgruppe (BEEK und OBE, 1976) beobachtete nach 200 R einer 100 kV Röntgenbestrahlung in der G₀-Phase des Zellzyklus in den schnell replizierenden Zellen (26 - 36 Stunden nach Kulturbeginn) höhere Aberrationsraten und Kleinkernzahlen als in den später replizierenden Zellen.

Im Gegensatz dazu stehen Befunde von SCOTT und LYONS (1979), die in menschlichen Lymphocyten nach 200 rad Röntgenbestrahlung mit Hilfe der BUdR-Methode erhoben wurden. Durch die Fluoreszenz-Plus-Giemsa-Färbetechnik ist es hier möglich, eindeutig zwischen Zellen zu unterscheiden, die sich nur einmal oder mehrmals in der Kultur geteilt haben. Bei Kulturzeiten von 40 Stunden bis 72 Stunden fanden diese Autoren keine unterschiedlich hohen Raten für dicentrische Chromosomen. Außerdem waren die dicentrischen Chromosomen in den Zellen der ersten Teilung Poissonverteilt, eine Tatsache, die ebenfalls für die Homogenität der Lymphocytenpopulationen bezüglich der chromosomalen Strahlenempfindlichkeit spricht.

In der vorliegenden Arbeit sollten Anhaltspunkte für potentielle Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Lymphocytenpopulationen bzw. Zellfraktionen an Hand von Dosis-Wirkungskurven für dicentrische Chromosomen gewonnen werden. Die ermittelten linear-quadratischen Beziehungen entsprechen früheren in unserem Labor erhobenen Befunden (79). Es zeigten sich keine Unterschiede in den Aberrationsraten bei Chromosomenpräparationen nach Vollblut- und BC-Kultur. Identische Befunde erheben SHARPE et al. (1969) nach Bestrahlung mit 250 kV-Röntgenstrahlen in einem Dosisbereich von 300 - 670 rad. Im Versuchsansatz T (Bestrahlung von Vollblut, Trennung und anschließende Kultivierung der T-Lymphocyten) waren nach Bestrahlung weniger dicentrische Chromosomen zu beobachten als in der Standardkultur (Bestrahlung von Vollblut ohne Trennung). Bestrahlt man hingegen vorher aus dem Vollblut abgetrennte T-Lymphocyten (Versuchsansatz xT), findet man nach Kultur der T-Zellen keine Unterschiede im Vergleich zur Standardkultur. Eine erhöhte Strahlenresistenz der gesamten T-Zellpopulation kann also nicht vorliegen.

Eine Erklärung für diesen Befund könnte in der Strahlenempfindlichkeit der Rosettenbildung liegen. Während SCHMIDTKE et al. (1976) bei neuramindasebehandelten Lymphocyten keine signifikante Abnahme der Rosettenbildungsfähigkeit der T-Zellen bei Bestrahlungsdosen bis zu 10.000 rad Röntgenstrahlung feststellen konnten, wiesen FACCHINI et al. (1976) nach, daß bereits nach 100 rad einer ^{60}Co - γ -Bestrahlung die Rosettenbildungsfähigkeit der T-Zellen um 20 % herabgesetzt war. BIRKELAND (1978) berichtet ebenfalls - leider ohne Angabe der benutzten Strahlenart - daß schon eine Dosis von 100 rad die Rosettenbildungsfähigkeit einschränkt. GUPTA und GOOD (1977) fanden, daß menschliche T-Lymphocyten mit Rezeptoren für IgM strahlenresistenter waren als solche

mit Rezeptoren für IgG. Auch hier war die benutzte Strahlenart nicht angegeben.

Geht man nun von Subpopulationen von T-Lymphocyten aus, die eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit, gemessen am induzierten Chromosomenschaden und an ihrer Fähigkeit mit SRBC Rosetten zu bilden aufweisen, so wäre es denkbar, daß z.B. aufgrund von strahlen-induzierten Membranveränderungen die sensible Subpopulation keine Rosetten mehr bilden könnte. Dadurch würden diese Zellen bei der Trennung der T- von den B-Zellen nicht zusammen mit den rosettenbildenden T-Zellen durch das Separationsmedium sedimentieren, sondern mit den nicht rosettierenden B-Zellen darüber stehenbleiben. Da nur die rosettenbildenden Zellen in die Kultur kommen, würde man nur Mitosen von diesen resistenten Zellen (mit entsprechend geringeren Aberrationsraten) erhalten. Andererseits hätte man dann in der B-Zellphase auch T-Lymphocyten. Dann müßte hier eine Stimulation möglich sein. Es gelang aber nie, nach Rosettentrennung die Zellen der Interphase zu stimulieren. Es wäre also möglich, daß eben diese T-Zellen, die keine Rosetten mehr bilden können, auch nicht in der Lage sind ihre "Helferfunktion" bei der B-Zell-Stimulation auszuüben. Trennt man hingegen erst die B- von den T-Zellen, so haben alle T-Zellen die gleiche Fähigkeit Rosetten zu bilden. Bei anschließender Bestrahlung ergibt sich aus der Summe der Aberrationsraten der sensiblen und der resistenten Subpopulationen eine Rate, die von der für die Standardkultur nicht signifikant verschieden ist. Endgültige Schlußfolgerungen sind nicht möglich, da entweder nur vor Bestrahlung getrennte Lymphocyten (51) oder nur nach Bestrahlung des Vollblutes getrennte Zellen (67) untersucht wurden.

4.4. Empfindlichkeit gegenüber chemischen Substanzen

Im Vergleich zu Untersuchungen nach Strahlenexposition existieren hierzu weit weniger Befunde. JØNSSON (1975) fand bei 15 Patienten mit Bindegewebskrankheiten vor, während und nach Prednison-Behandlung keine Veränderung der absoluten und relativen Zahl der T- und B-Lymphocyten. Bei 16 Patienten mit gleichem Krankheitsbild vor, während und nach Kombinationstherapie mit Prednison, Azathioprin und Cyclophosphamid, sowie bei 15 Psoriasis-Patienten vor und während Methotrexat-Applikation zeigten sich signifikante, parallele Abnahmen der absoluten T- und B-Zellzahlen. Lymphocyten ohne diese Marker (Null-Zellen) nahmen in ihrer Gesamtzahl zu. Als mögliche Erklärung dafür wird der Verlust der betreffenden Marker bei alten B- und T-Zellen, oder die Produktion markerloser Zellen während der cytostatischen Behandlung angegeben.

SALSANO et al. (1976) untersuchten 20 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie unter Kombinations-therapie von Chlorambucil und Prednison oder Cyclophosphamid und Prednison. Auch sie fanden im Therapieverlauf eine Zunahme der Null-Zellen. Die Zahl der B-Zellen nahm ab. Während die absolute Zahl der T-Lymphocyten ebenfalls abnahm, blieb ihr prozentualer Anteil an der Gesamtlymphocytenzahl gleich.

Durch die Bestimmung von Überlebensraten fanden IQBAL et al. (1976) bei BLM-Behandlung von L 1210-Zellen Hinweise auf potentiell unterschiedlich empfindliche Subpopulationen. Sie erhielten ebenso biphasische Überlebenskurven wie BARRANCO und HUMPHREY (1971) in Versuchen mit CHO-Zellen, DREWINKO et al. (1972 b) bei menschlichen Lymphoma-Zellen, sowie TERASIMA et al. (1972) mit Tumorzellen der Maus und Affennierenzellen. TISMAN et al. (1973) fanden eine BLM-bedingte Unterdrückung der PHA-Stimulation bei Humanlymphocyten, während

die PWM-induzierte Blastogenese wesentlich weniger reduziert wurde. Zusammen mit der Annahme, daß PHA nur T-Zellen stimuliert, PWM aber sowohl T- als auch B-Zellen, kommen die Autoren zu dem Schluß, daß die T-Lymphocyten empfindlicher gegenüber BLM seien. Da jedoch PHA nicht streng T-zellspezifisch wirkt, ist diese Folgerung nicht unbedingt schlüssig. Cytogenetische Befunde zur Klärung der Frage über das Auftreten von Lymphocytenpopulationen bzw. Zellfraktion mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber chemischen Substanzen liegen nicht vor.

In einer eigenen, früher publizierten Arbeit (24) wurde die cytogenetische Wirkung von Bleomycin (BLM) auf menschliche Lymphocyten untersucht. Dabei ergab eine Behandlung des Vollblutes in der G_0 -Phase des Zellzyklus eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung für dicentrische Chromosomen. Die interzelluläre Verteilung dieser Aberrationen wies eine "over-dispersion" auf, d.h. die relative Varianz war stets >1 .

In der vorliegenden Arbeit entsprechen die Bedingungen der BC- und Standardkulturen einer G_0 -Behandlung. Die cytogenetischen Befunde sind identisch. Auf Grund der beobachteten nicht zufälligen interzellulären Verteilung dicentrischer Chromosomen ist es naheliegend, eine selektive Schädigung besonders empfindlicher Lymphocyten anzunehmen. Die Dosis-Wirkungskurven für die Ansätze xL und xT verlaufen zwar flacher als die für S, jedoch lassen sich statistisch keine signifikanten Unterschiede der Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisen. Trotzdem kann dieser Befund sicher nicht als repräsentativ angesehen werden, da für die Standardkultur nur eine schlechte Anpassung der linearen Dosis-Wirkungsbeziehung vorliegt. Die relative Varianz ist aber auch bei xL und xT stets >1 . Bei einem Vergleich der besser angepassten Funktionen für xL und xT

mit L und T lassen sich jedoch eindeutige Aussagen über einen flacheren Verlauf der ersten beiden Dosis-Wirkungskurven machen. Die Unterschiede könnten durch die bei der Trennung entstehenden veränderten Applikationsbedingungen von BLM hervorgerufen werden. Bei der BLM-Applikation in der G_0 -Phase des Zellzyklus wird nach drei Stunden Inkubation das BLM aus der Zellsuspension mit Hank'scher Lösung bzw. F 10 Medium ausgewaschen und die Zellen werden anschließend wie üblich kultiviert. Während bei den Präparationen S, L und T Vollblut mit BLM behandelt wird, werden bei xL nur die Zellen des BC und xT nur die T-Lymphocyten 3 Stunden mit BLM inkubiert. Erythrocyten sind nur in geringer Zahl bzw. gar nicht vorhanden. Da aber BLM durch Sulphydryl-Gruppen aktiviert werden muß bevor es in modifizierter Form selektiv auf die DNA einwirken kann (59), die Erythrocytenmembranen aber freie SH-Gruppen aufweisen, könnte die Anwesenheit von SH-Gruppen in ausreichender Zahl ein bestimmender Faktor für die Wirksamkeit von BLM in den verschiedenen Versuchsansätzen sein.

Berücksichtigt man, daß die hier erhobenen Befunde nur mit relativ geringen Zellzahlen und jeweils nur vier Konzentrationen erhoben werden konnten und somit großen statistischen Schwankungen unterliegen, so ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Lymphocytenpräparationen gegenüber BLM, gemessen am induzierten Chromosomenschieden, nicht ganz auszuschließen. Zellen mit multiplen Chromosomendefekten könnten z.B. aus Lymphocytenpopulationen stammen, die sowohl Rezeptoren für SRBC (T-Zell-Charakter) als auch Oberflächen-Immunglobulin (B-Zell-Charakter) aufweisen.

Verschiedene Autoren (9, 23, 49, 54) geben für die Häufigkeit von Lymphocyten die sowohl B- als auch T-Zellmarker besitzen, Zahlen zwischen 1 und 10 % an. Wenn es

also Zellen gibt, die unter herkömmlichen Markierungsbedingungen (Immunfluoreszenz) als B-Lymphocyten identifiziert werden, aber mit SRBC Rosetten bilden können, so gelangen diese bei der anschließenden Trennung über Ficoll in die T-Zellfraktion. Wären diese Zellen der BLM-Behandlung gegenüber sensibler als die B- oder T-Lymphocyten, so könnten sie diejenigen sein, die sowohl in der Standardkultur und BC-Kultur als auch in der T-Zellkultur auf Grund ihrer hohen Aberrationsrate für die "over-dispersion" verantwortlich sind.

DICKLER et al. (1974) nehmen an, daß diese Zellen mit B- und T-Zellmarkern eine eigene Population darstellen, da sowohl bei Patienten mit T- oder B-Zell-Leukämien als auch in lymphoblastoiden Zelllinien solche Zellen nur in verschwindend geringen Zahlen vorhanden waren.

JONDAL et al. (1972) berichten hingegen, daß es keine doppelt markierbaren Zellen im peripheren Blut gibt, während sie immerhin bis zu 12 % der Lymphocyten fanden, die keinen der beiden Oberflächenmarker aufwiesen. Zu dieser Kategorie können die schwer gestörten Zellen nicht gehören, denn diese sind in der T-Zellfraktion nach Rosettentrennung nicht vorhanden; trotzdem sind die schwer gestörten Metaphaseplatten zu beobachten.

5. Zusammenfassung

1. Zur Gewinnung von Humanlymphocytenpopulationen und weitgehend erythrocytenfreien angereicherten Leucocytenfraktionen aus dem Vollblut wurde die Trennung über Nylon-Wolle, die Rosetten-Technik und die "Buffy-Coat"-Methode benutzt. Die Rosetten-Technik wurde so modifiziert, daß sie das geeignetste Verfahren darstellt, um aus relativ geringen Mengen Vollblut Lymphocytenpopulationen für cytogenetische Analysen zu gewinnen.
2. Cytogenetische Analysen konnten im Vollblut und reinen T-Zell-Kulturen sowie in Zellen des "Buffy-Coats" durchgeführt werden. In reinen B-Zellkulturen war selbst nach 96 Stunden keine mitogene Stimulation zu erreichen.
3. Parameter der Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen und Bleomycin waren dicentrische Chromosomen, für die Dosis-Wirkungsbeziehungen errechnet wurden.
4. Chromosomenuntersuchungen an den Zellen des "Buffy-Coats" ergaben keine Hinweise auf eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit im Vergleich zu Vollblutkulturen.
5. In reinen T-Zellkulturen zeigten T-Lymphocyten, die nach Strahlenexposition des Vollblutes abgetrennt worden waren geringere Aberrationsraten als Lymphocyten, die nach Vollblutbestrahlung ohne Trennung kultiviert wurden. Eine größere Strahlenresistenz der T-Zellen kann auf Grund der cytogenetischen Untersuchungen nicht kausal abgeleitet werden. Die hierzu vorliegenden Befunde können auch durch Einflüsse der Strahlung auf die für die Lymphocytentrennung notwendige Rosettenbildung erklärt werden.

6. Bei Bleomycin-Exposition ergab die Behandlung von vorher abgetrennten Leukocyten bzw. T-Lymphocyten geringere Aberrationsraten als die Behandlung vor der Trennung. Verschiedene Empfindlichkeiten können hieraus nicht kausal abgeleitet werden. Da für die Aktivierung von BLM freie SH-Gruppen notwendig sind, können die Befunde auch damit erklärt werden, daß in Gegenwart von Erythrocyten andere Aktivierungsraten auftreten als in erythrocyten freien Zellfraktionen.
7. Für eine cytogenetische Dosimetrie bzw. Mutagenitätstestung erscheint es nicht nötig, von der Vollblutkulturmethode abzuweichen.

6. Literaturverzeichnis

1. ASMA, G.E.M., SCHUIT, H.R.E., HIJMANS, W.:
The determination of numbers of T and B lymphocytes
in the blood of children and adults by the direct
immunofluorescence technique.
Clin. exp. Immunol. 29, 286-294 (1977).
2. BACH, J.F.:
Evaluation of T-cells and thymic serum factors in
man using the rosette technique.
Transplant. Rev. 16, 196-217 (1973).
3. BANGHAM, A.D., FLEMANS, R., HEARD, D.H., SEAMAN, G.V.F.:
An apparatus for microelectrophoresis of
small particles.
Nature 182, 642-644 (1958).
4. BARKER, C.R., WORMAN, C.P., SMITH, J.L.:
Purification and quantification of T and B lymphocytes
by an affinity method.
Immunol. 29, 765-777 (1975).
5. BARRANCO, S.C., HUMPHREY, R.M.:
The effects of Bleomycin on survival and cell progression
in Chinese Hamster Cells in vitro.
Cancer Research 31, 1218-1223 (1971).
6. BAUCHINGER, M.:
Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen.
Sonderdruck aus: Handbuch der medizinischen Radiologie.
Springer-Verlag, Berlin (1972).
7. BEEK, B., OBE, G.:
The human leukocyte test system
X. Higher sensitivity to X-irradiation in the G₀ stage of
the cell cycle of early as compared to late replicating cells.
Human. Genet. 35, 57-70 (1976).

8. BENDER, M.A., BREWEN, J.G.:
Factors influencing chromosome aberration yields in
the human peripheral leukocyte systems.
Mutation Res. 8, 383-399 (1969).
9. BENTWICH, Z., DOUGLAS, S.D. SIEGAL, F.P., KUNKEL, H.G.:
Human lymphocyte-sheep erythrocyte rosette formation:
Some characteristics of the interaction.
Clinical Immunology and Immunopathology 1, 511-522 (1973 a).
10. BENTWICH, Z., DOUGLAS, S.D., SKUTELSKY, F., KUNKEL, H.G.:
Sheep red cell binding to human lymphocytes treated
with neuraminidase; enhancement of T cell binding and
identification of a subpopulation of B cells.
The Journal of Experimental Medicine 137, 1532-1537 (1973 b).
11. BIANCO, C., PATRICK, R., NUSSENZWEIG, V.:
A population of lymphocytes bearing a membran receptor
for antigen-antibody-complement complexes.
The Journal of Experimental Medicine 132, 702-720 (1970).
12. BIRKELAND, S.A.:
In vitro radiosensitivity of human T and B lymphocytes
evaluated using lymphocyte transformation tests and
rosette formation tests.
Int. Arch. Allergy appl. Immun. 57, 425-434 (1978).
13. BRAIN, P., GORDON, J., WILLETTS, W.A.:
Rosette formation by peripheral lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 6, 681-688 (1970).
14. BROWN, G., GREAVES, M.F.:
Enumeration of absolute numbers of T and B lymphocytes
in human blood.
Scand. J. Immunol. 3, 161-172 (1974).

15. CARDILLO, M., KRAUSE, E., SCIORRA, L.J.:
Human chromosome preparation obtained from immuno-
absorbent separated T- and B-cells.
Clinical Genetics 13, 271-277 (1978).

16. CAROSELLA, E.D., PAULONE, I. ROHWEDDER, R.W., BACHMANN, A.E.:
Enrichment in spontaneous and complement dependent
rosette forming cell populations using Ficoll-Hypaque
gradient centrifugation.
Experientia 32, 11, 1484-1486 (1976).

17. CHESSE, L., MACDERMOTT, R.P., SCHLOSSMAN, S.F.:
Immunological functions of isolated human lymphocyte
subpopulations.
I) Quantitative isolation of human T and B cells and
response to mitogens.
The Journal of Immunology 113, 4, 1113-1121 (1974).

18. CHOLLET, P., CHASSAGNE, I., SAUVEZIE, B., CODEGNAT, J.M.,
PLAGNE, R.:
Electrophoretic mobility of human lymphocytes purified
by nylon wool columns and spontaneous sheep red blood
cells rosetting techniques correlation with immuno-
fluorescence.
Journal of Immunological Methods 11, 25-35 (1976).

19. CHOLLET, P., CHASSAGNE, J., THIERRY, C., SAUVEZIE, B.,
SERROU, B., PLAGNE, R.:
Isolation and electrophoretic mobility of three lymphoid
populations in normal human blood.
Europ. J. Cancer, 13, 333-339 (1977).

20. CLOT, J., CHARMASSON, E., BROCHIER, J.:
Age-dependent changes of human blood lymphocyte subpopulations.
Clin. exp. Immunol. 32, 346-351 (1972).

21. CLOT, J., MASSIP, H., MATHIEU, O.:
In vitro studies on human B and T cell purified populations.
Stimulation by mitogens and allogenic cells, and quantitative binding of phytomitogens.
Immunology 29, 445-453 (1975).
22. DENMAN, A.M.:
Methods of separating human blood lymphoid cell populations.
Journal of Immunological Methods 2, 331-351 (1973).
23. DICKLER, H.B., ADKINSON, N.F., TERRY, W.D.:
Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers.
Nature 247, 213-215 (1974).
24. DRESP, J., SCHMID, E., BAUCHINGER, M.:
The cytogenetic effect of Bleomycin on human peripheral lymphocytes in vitro and in vivo.
Mutation Res. 56, 341-353 (1978).
25. DREWINKO, B., HUMPHREY, R.M., TRUJILLO, J.M.:
The radiation response of a long-term culture of human lymphoid cells.
I. Asynchronous populations.
Int. J. Radiat. Biol. 21, 4, 361-373 (1972 a).
26. DREWINKO, B., NOVAK, J.K., BARRANCO, S.C.:
The response of human lymphoma cells in vitro to Bleomycin and 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea.
Cancer Res. 32, 1206-1208 (1972 b).
27. DUDIN, G., BEEK, B., OBE, G.:
The human leukocyte test system.
I. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures.
Mutation Res. 23, 279-281 (1974).

28. EDWARDS, A.A.:
The evidence for one-hit chromosome exchanges.
Radiat. and Environm. Biophys. 14, 161-165 (1977).
29. EISEN, S.A., WEDNER, H.J. , PARKER, C.N.:
Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes
using nylon wool columns.
Immunological Communications 1, 6, 571-577 (1972).
30. EPSTEIN, L., KRETH, W., HERZENBERG, L.A.:
Fluorescence-activated cell sorting of human T and B
lymphocytes. II. Identification of the cell type
responsible for interferon production and cell proli-
feration in response to mitogens.
Cellular Immunology 12, 407-421 (1974).
31. FACCHINI, A., MARALDI, N.M., BARTOLI, S., FARULLA, A.,
MANZOLI, F.A.:
Changes in membrane receptors of B and T human lymphocytes
exposed to ^{60}Co gamma rays.
Radiation Research 68, 339-348 (1976).
32. FAUCI, A.S., PRATT, K.R.K., WHALEN, G.:
Activation of human B lymphocytes.
II. Cellular Interactions in the PFC response of human
tonsillar and peripheral blood B lymphocytes to polyclonal
activation by PWM.
The Journal of Immunology 117, 6, 2100-2104 (1976).
33. FRÖLAND, S.S.:
Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A
probable marker of T lymphocytes.
Scand. I. Immunol. 1, 269-280 (1972).

34. GALILI U., SCHLESINGER, M.:
The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells.
The Journal of Immunology 112, 5, 1628-1634 (1974).
35. GEHA, R.S., MERLER, E.:
Response of human thymus derived (T) and non-thymus-derived (B) lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro.
Europ. J. Immunol. 4, 193-199 (1974).
36. GMELIG-MEYLING, F., UYTDEHAG, A.G.C.N., BALLIEUX, R.E.:
Human B-cell activation in vitro.
T cell-dependent PWM-induced differentiation of blood B-lymphocytes.
Cellular Immunology 33, 156-169 (1977).
37. GREAVES, M., JANOSSY, G., DÖNHOF, M.:
Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens.
The Journal of Experimental Medicine 140, 1-18 (1974).
38. GREENWALT, T.J., GAJEWSKI, M.S., MCKENNA, J.L.:
A new method for preparing buffy-coat-poor blood.
Transfusion 2, 221-229 (1962).
39. GUPTA, S., GOOD, R.A.:
Subpopulation of human T lymphocytes.
II. Effect of Thymopoietin, Corticosteroids and Irradiation.
Cellular Immunology 34, 10-18 (1977).
40. HAN, T., PAULY, J.L., MINOWA, J.:
In vitro preferential effect of irradiation on cultured T lymphoid cell line.
Clin. exp. Immunol. 17, 455-462 (1974)

41. HEDGES, M.J., HORNSEY, S.:
The effect of X-rays and neutrons on lymphocyte death and transformation.
Int. J. Radiat. Biol. 33,3, 291-300 (1978).
42. HERZENBERG, L.A., SWEET, R.G., HERZENBERG, L.A.:
Fluorescence-activated cell sorting.
Sci. Am. 234, 108-117 (1976).
43. IQBAL, Z.M., KOHN, K.W., EWIG, R.A.G., FORNACE, A.I.
Single-strand scission and repair of DNA in mammalian cells by Bleomycin.
Cancer Research 36, 3834-3838 (1976).
44. JØNSSON, V.:
B, T and O lymphocytes in man during treatment with prednisone and cytostatic agents.
Scand. J. Immunol. 4,7, 754 (1975).
45. JONDAL, M., HOLM, G., WIGZELL, H.:
Surface markers on human T and B lymphocytes.
I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells.
The Journal of Experimental Medicine 136, 207-215 (1972).
46. JONDAL, M.:
Surface markers on human B and T lymphocytes.
IV. Distribution of surface markers on resting and blast-transformed lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 3, 739-747 (1974 a).
47. JONDAL, M.:
Surface markers on human B and T lymphocytes.
V. Charakterization of the lymphoproliferative response to three different lectins and allogenic lymphocytes by surface markers.
Scand. J. Immunol. 3, 749-755, (1974 b).

48. JULIUS, M.H., SIMPSON, E., HERZENBERG, L.A.:
A rapid method for the isolation of functional thymus
derived lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645-649 (1973).
49. KAPLAN, M.E., CLARK, C.:
An improved rosetting assay for detection of human
T-lymphocytes.
Journal of Immunological Methods 5, 131-135 (1974).
50. KORENBERG, J.R.:
Improved technique for human leukocyte cultures.
Hum. Genet. 48, 125-126, (1979).
51. KWAN, D.K., NORMAN, A.:
Radiosensitivity of human lymphocytes and thymocytes.
Radiation Research 69, 143-151 (1977).
52. LAMVIK, J.O.:
Separation of lymphocytes from human blood.
Acta haemat. 35, 294-303 (1966).
53. LAY, W., MENDES, N.F., BIANCO, C., NUSSENZWEIG, V.:
Binding of sheep red blood cells a large population of
human lymphocytes.
Nature 230, 531-532 (1971).
54. LEE, Y., YOSHIZAWA, Y., CARR, R.G., YOKOYAMA, M.M.:
AET-treated sheep red blood cells and immunobeads for
combined detection of human peripheral lymphocyte
subpopulations.
Z. Immun.-Forsch. 155, 232-239 (1979).

55. LOHRMANN, H.-P., NOVIKOV, L., GRAW, R.G.:
Cellular interaction in the proliferative response of human T and B lymphocytes to phytomitogens and allogenic lymphocytes.
The Journal of Experimental Medicine 139, 1553-1567 (1974).
56. LUCHNIK, N.V.:
Do one-hit chromosome exchanges exist? Dose response relation for irradiated human lymphocytes.
Rad. and Environm. Biophys. 12, 197-204 (1975).
57. MELLSTEDT, H.:
In vitro activation of human T and B lymphocytes by PWM.
Clin. exp. Immunol. 19, 75-82 (1975).
58. MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A.:
Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.
Exptl. Cell Research 20, 613-616 (1960).
59. NAGAI, K., YAMAKI, H., SUZUKI, H., TANAKA, N., UMEZAWA, H.:
The combined effects of Bleomycin and sulfhydryl compounds on the thermal denaturation of DNA.
Biochimica et Biophysica Acta 179, 165-171 (1969).
60. OPPENHEIM, J.J., LEVENTHAL, B.G., HERSH, E.M.:
The transformation of column-purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli.
The Journal of Immunology 101, 2, 262-270 (1968).
61. PANDOLFI, F., KURNICK, J.T., NILSSON, K., FORSBECK, K., WIGZELL, H.:
Rosette formation with goat erythrocytes. A marker for human T lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 32, 504-509 (1978).

62. PANG, G.T.M., WIGGINS, P.M., WILSON, J.D.:
Nature of the union between sheep red blood cells and
T lymphocytes.
Int. Arch. Allergy appl. Immun. 51, 751-756 (1976)
63. PAPAMICHAIL, M., GUTIERREZ, C., HOLBOROW, E.J.:
The use of nylon fibre as a method of separating human
lymphocyte subpopulations.
Journal of Immunological Methods 11, 225-229 (1976).
64. PELLEGRINO, M.A., FERRONE, S., THEOFILOPOULOS, A.N.:
Isolation of human T and B lymphocytes by rosette
formation with AET-treated sheep red blood cells and with
monkey red blood cells.
Journal of Immunological Methods 11, 273-279 (1976).
65. POSCHMANN, A., FISCHER, K.:
Neuraminidase action in vivo: Immunofluorescent detection
of cryptantigens.
Behring Inst. Mitt. 55, 129-139 (1974).
66. POTTER, M.R., MOORE, M.:
PHA stimulation of separated human lymphocyte populations.
Clin. exp. Immunol. 21, 456-467 (1975).
67. PROSSER, J.S.:
Survival of human T and B lymphocytes after X-Irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. 30, 5, 459-465 (1976).
68. RABINOWITZ, Y.:
Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes
and monocytes on glass columns, including tissue culture
observation.
Blood 23, 6, 811-828 (1964)

69. RADHAKRISHNA RAO, C., CHAKRAVARTI, J.M.:
Some small sample tests of significance for a poisson distribution.
Biometrics 12, 264-282 (1956).
70. RICKINSON, A.B., ILBERY, P.L.T.:
The effect of radiation upon lymphocyte response to PHA.
Cell Tissue Kinet. 4, 549-562 (1971).
71. RINGDEN, D., MÖLLER, E.:
Use of mitogens for the functional characterization of human lymphocyte subpopulations.
Scand. I. Immunol. 5, Suppl. 5, 125-134 (1976).
72. ROSZMAN, T.L., BROOKS, W.H., MUSE, K.N.:
Effects of preincubating human peripheral blood lymphocytes on their ability to bind sheep red blood cells.
Journal of Immunological Methods 14, 93-100 (1977).
73. SABOLOVIĆ, D., SABOLOVIĆ, N., DUMONT, F.:
Identification of T and B cells in mouse and man.
The Lancet II, 927 (1972).
74. SALSANO, F., FROLAND, S.S., NANTVIG, J.B., MANDELLI, F.:
Chronic lymphocytic leukemia: Studies on the effect of drug treatment on different lymphocytic subpopulations.
Scand. J. Immunol. 5, 1185-1190, (1976).
75. SASAKI, M.S., MATSUBARA, S.:
Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma-ray irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. 32, 5, 439-445 (1977).

76. SAVAGE, J.R.K.:
Sites of radiation induced chromosome exchanges.
Current Topics in Rad. Res. VI, 129-194 (1970).
77. SCHLESINGER, M., GALILI, U.:
The effect of neuraminidase on the formation of E-rosettes
by human peripheral lymphocytes and SRBC.
Behring Inst. Mitt. 55, 272-276 (1974).
78. SCHMID, E., BAUCHINGER, M., HUG O.:
Chromosomenaberrationen menschlicher Lymphocyten nach
Röntgenbestrahlung in vitro.
I. Qualitative und quantitative Aspekte der Dosis-Wirkungs-
Beziehung.
Mutation Res. 16, 307-317 (1972).
79. SCHMID, E., BAUCHINGER, M., MERGENTHALER, W.:
Analysis of the time relationship for the interaction of
X-ray-induced primary breaks in the formation of dicentric
chromosomes.
Int. J. Radiat. Biol. 30,4, 339-346 (1976).
80. SCHMIDTKE, J.R., FERGUSON, R.M., SIMMONS, R.L.:
Effect of X-irradiation and neuraminidase on the capacity
of human lymphocytes to form rosettes with sheep red
blood cells.
Transplantation 22,6, 635-638 (1976).
81. SCHNEEBERGER, H.:
Linearitätsteste der k-dimensionalen Regressionsgleichung
und Anwendung.
Monatshefte für Mathematik 64, 361-373 (1960).

82. SCOTT, D., Lyons, C.Y.:
Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage.
Nature 278, 756-758 (1979).
83. SERROU, B., THIERRY, C., CHOLLET, P., CHASSAGNE, J.,
SAUVEZIE, B., BIDET, J.M., PLAGNE, R.:
Differences in mitogen response and elektrophoretic mobility of two T-lymphocyte subpopulations.
Europ. J. Cancer 13, 361-365 (1977).
84. SHARPE, H.B.A., SCOTT, D., DOLPHIN, G.W.:
Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by X-irradiation in vitro:
The effect of culture techniques and blood donors on aberration yield.
Mutation Res. 7, 453-461 (1969).
85. SHORTMAN, K., CEROTTINI, J.C., BRUNNER, K.T.:
The separation of sub-populations of T and B lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 2, 313-319 (1972).
86. SHORTMAN, K.:
Separation methods for lymphocyte populations in:
Contemporary Topics in Molecular Immunology Vol. 3,
Hrsg.G.L. ADA Plenum Press, N.Y. and London, 161-203 (1974).
87. SHORTMAN, K., RYDEN, A., DUNKLEY, M., VON BÖHMER, H.:
Some requirements for the response of separated T-cell sub-populations to the mitogens PHA and ConA.
AJEBAK 55, 5, 585-603 (1977).
88. STEFFEN, J., MICHALOWSKI, A.:
Heterogeneous chromosomal radiosensitivity of PHA-stimulated human blood lymphocytes in culture.
Mutation Res. 17, 367-376, (1973).

89. STEIN, G.:
Separation of human lymphoid cells by preparative cell electrophoresis.
Z. Immun.-Forsch. 150, 68-80 (1975 a).
90. STEIN, G.:
Separation of human lymphoid cells by preparative cell electrophoresis.
II. Free-Flow elektrophoretic separation of human blood cells.
Biomedicine 23, 5-11 (1975 b).
91. STEIN, G.:
Separation of human lymphoid cells by preparative cell electrophoresis.
III. Studies on cells of lymphoid organs in hematological normal persons.
Biomedicine 24, 106-111 (1976).
92. STRELKAUSKAS, A.J., TEODORESCU, M., DRAY, S.:
Enumeration and isolation of human T and B lymphocytes by rosette formation with antibody-coated erythrocytes.
Clin. exp. Immunol. 22, 62-71 (1975).
93. TERASIMA, T., TAKABE, Y., KATSUMATA, T., WATANABE, M., UMEZAWA, H.:
Effect of Bleomycin on mammalian cell survival.
J. Natl. Cancer Inst. 49, 1093-1100 (1972).
94. TISMAN, G., HERBERT, V., GO, L.T., BRENNER, Z.:
Marked immunosuppression with minimal myelosuppression by Bleomycin in vitro.
Blood 41, 5, 721-726 (1973).

95. TRIZIO, D., CUDKOWICZ G.:
Separation of T and B lymphocytes by Nylon wool columns:
Evaluation of efficacy by functional assays in vivo.
The Journal of Immunology 113, 4, 1093-1097 (1974).
96. WARREN, L., BUCK, C.A.:
The synthesis and repair of the cell surface.
Behring Inst. Mitt. 55, 224-230 (1974).
97. WEINER, M.S., BIANCO, C., NUSSENZWEIG, V.:
Enhanced binding of neuraminidase treated sheep erythrocytes
to human T-lymphocytes.
Blood 42, 939-946 (1973).
98. WHITTINGHAM, S., MACKAY, I.R.:
Rosette formation by human thymocytes.
Cellular Immunology 6, 362-367 (1973).
99. WIIG, J.N., THUNOLD, S.:
Electrophoresis of lymphoid cells.
Characterization of human B and T cells in peripheral
lymphoid tissues.
Clin. exp. Immunol. 15, 497-506. (1973).
100. WYBRAN, J., CARR, M.C., FUDENBERG, H.H.:
The human rosette forming cell as a marker of a population
of thymus derived cells.
The Journal of Clinical Investigation 51, 2537-2542 (1972).
101. WYBRAN, J., CARR, M.C., FUDENBERG, H.H.:
Effect of serum on human rosette-forming cells in fetuses
and adult blood.
Clinical Immunology and Immunopathology 1, 408-413 (1973).

102. YU, D.T.Y.:
Human lymphocyte receptor movement induced by sheep erythrocyte binding:
Effect of temperature and Neuraminidase treatment.
Cellular Immunology 14, 313-320 (1974).
103. YU, D.T.Y.
Human lymphocyte subpopulation:
Giant human red blood cell rosettes.
Journal of Immunological Methods 15, 67-76 (1977).
104. ZAALBERG, O.B.:
A simple method for detecting single antibody-forming cells.
Nature 202, 1231 (1964).
105. ZEILLER, K., HANNIG, K.:
Free flow electrophoretic separation of lymphocytes.
Evidence for specific organ distribution of lymphoid cells.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1162-1167 (1971).
106. ZEILLER, K., HOLZBERG, E., PASCHER, G., HANNIG, K.:
Free flow electrophoretic separation of T and B lymphocytes. Evidence for various subpopulations of B cells.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 105-110 (1972).
107. ZEILLER, K., SCHINDLER, R.K.:
Neuraminidase-susceptible sialic acid groups on surfaces of T cells subpopulations at distinct stages of development.
Behring Inst. Mitt. 55, 246-253 (1974).

Herrn Professor Dr. H. Cleve danke ich für die Berichterstattung, Herrn PD Dr. E. Schmid für die Unterstützung bei den statistischen Berechnungen.

Frau G. Rocznik gilt mein Dank für die Ausführung der Fotoarbeiten und Frau H. Funke für die Schreibarbeiten bei der Erstellung des Manuskripts.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. M. Bauchinger für die Themstellung und seine großzügige Unterstützung, die er mir in vielen Diskussionen und durch zeitliches Entgegenkommen gewährte.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 14. September 1948 in Berlin als Sohn von Inge Dresn. geb. Mollenhauer und Horst Dresp geboren.

Ostern 1955 trat ich die Volksschule am Földerich-Platz in Berlin-Spandau ein. Im Herbst des gleichen Jahres zog ich mit meinen Eltern nach München und besuchte hier bis 1959 die Volksschule am Gotzinger Platz. Anschließend trat ich in die damalige Klenze-Oberrealschule ein, an der ich 1968 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Brauereitechnologie an der Technischen Universität Berlin. Zum Sommersemester 1969 wechselte ich zum Studium der Biologie an die Freie Universität Berlin, an der ich im Wintersemester 1970/71 die Diplomvorprüfung ablegte. Anschließend studierte ich zwei Semester an der Ruhruniversität Bochum und immatrikulierte mich zum Sommersemester 1972 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, an der ich mich im Sommersemester 1974 der Diplomprüfung unterzog. Seit dem 1. September 1974 arbeite ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Manfred Bauchinger in der Abteilung für Strahlenbiologie des Instituts für Biologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung.

